



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ У ЛЕСКОВЦУ



Марија (С.) Тасић

**НАНОЧЕСТИЦЕ СРЕБРА И ЗЛАТА
СТАБИЛИЗОВАНЕ БИЉНИМ
ЕКСТРАКТИМА КАО ОСНОВА ЗА
ИЗРАДУ ТОПИКАЛНИХ ХИДРОГЕЛОВА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Лесковац, 2026.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVATS



Marija (S.) Taciñ

**SILVER AND GOLD NANOPARTICLES
STABILIZED WITH PLANT EXTRACTS AS
A BASIS FOR THE PRODUCTION OF
TOPICAL HYDROGELS**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2026.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: Др Драган Цветковић, редовни професор, Универзитет у Нишу,
Технолошки факултет у Лесковцу

Наслов: Наночестице сребра и злата стабилизоване биљним екстрактима
као основа за израду топикалних хидрогелова

Резиме: Наночестице сребра и злата имају значајну примену у медицини и фармацији, захваљујући својим специфичним својствима као што су мала величина, висок однос површине и запремине, изражена биолошка активност и добра биокомпатибилност. Предмет ове докторске дисертације била је зелена синтеза наночестица сребра и злата употребом биомолекула из водених екстраката биљака, као и процена њихове потенцијалне примене у козметичким формулацијама.

Истраживања су била усмерена на развој поступака зелене синтезе и стабилизације наночестица сребра и злата коришћењем водених екстраката листова гајене јагоде (*Fragaria × ananassa* Duch.), самоникле малине (*Rubus idaeus* L.) и купине (*Rubus* spp.), добијених екстракцијом на собној температури и температури кључања. Листови наведених биљака, из породице Rosaceae, богати су биомолекулима који могу имати улогу редукционих и стабилизационих агенаса у процесу синтезе наночестица. Хемијски састав водених екстраката обухвата ароматичне угљоводонике, алкоhole, кетоне, алдехиде, монотерпене, C13-норизопреноиде и фенолна једињења, а анализиран је применом UHPLC-MS и ICP-OES метода.

Синтетисане наночестице сребра и злата окарактерисане су применом више аналитичких техника, укључујући UV-Vis и FTIR спектрофотометрију, XRD, SEM, EDX и DLS анализу. Испитана је њихова стабилност, као и биолошка активност, укључујући антиоксидативна, антимикробна и цитотоксична

својства.

Окарактерисане наночестице су даље коришћене као активне компоненте у формулацији хидрогелова намењених потенцијалној топикалној примени. Физичко-хемијске карактеристике добијених хидрогелова (pH вредност, електрична проводљивост и вискозност), њихова стабилност, као и биолошка активност (антиоксидативна и антиинфламаторна) праћене су у дефинисаним временским интервалима. Фотопротективни потенцијал формулација процењен је одређивањем заштитног фактора, критичне таласне дужине, UVA Star вредности, индекса безбедности и UVA/UVB односа.

Добијени резултати указују да су развијени хидрогелови стабилни системи током једногодишњег складиштења у мраку на температурама од $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, уз очување структурног и хемијског интегритета. Тестиране формулације показале су задовољавајућу стабилност, фотопротективни и биолошки потенцијал, што указује на њихову перспективну примену у козметичким и медицинским препаратима.

Научна област:

Технолошко инжењерство

Научна
дисциплина:

Материјали и хемијске технологије

Кључне речи:

zelena sinteza; nanočestice srebra; nanočestice zlata; biljni ekstrakti;
hidrogelovi; biološka aktivnost; fotoprotektivna aktivnost

УДК:

546.57+546.59 615.322 544.733.432 (043.3)

CERIF
класификација:

T 350 Хемијска технологија и инжењеринг

Тип лиценце
Креативне

CC BY-NC-ND

заједнице:

--

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Dr Dragan Cvetković, Full Professor, University of Nis, Faculty of Technology

Title:

Silver and gold nanoparticles stabilized with plant extracts as a basis for the production of topical hydrogels

Abstract:

Silver and gold nanoparticles have found significant applications in medicine and pharmacy due to their unique properties, such as small size, high surface-to-volume ratio, pronounced biological activity, and good biocompatibility. The subject of this thesis was the green synthesis of silver and gold nanoparticles using biomolecules from aqueous plant extracts, and the investigation of their potential application in cosmetic formulations.

The research was focused on the development of green synthesis and stabilization procedures for silver and gold nanoparticles using aqueous leaf extracts of cultivated strawberry (<i>Fragaria × ananassa</i> Duch.), wild raspberry (<i>Rubus idaeus</i> L.), and blackberry (<i>Rubus</i> spp.), obtained by extraction at room and boiling temperature. The leaves of these plants, belonging to the Rosaceae family, are rich in biomolecules acting as reducing and stabilizing agents. The chemical composition of the extracts includes aromatic hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, monoterpenes, C13-norisoprenoids, and phenolic compounds, and was analyzed using UHPLC-MS and ICP-OES techniques.

The synthesized nanoparticles were characterized using various analytical techniques, including UV-Vis and FTIR spectrophotometry, XRD, SEM, EDX, and DLS analysis. Their stability and biological activity, including antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic properties, were evaluated.

The characterized nanoparticles were subsequently incorporated into hydrogels intended for potential topical application. The physicochemical properties of the obtained hydrogels (pH value, electrical conductivity, and viscosity), their stability, and biological activity (antioxidant and anti-inflammatory) were monitored over defined time intervals. The photoprotective potential of the formulations was assessed by determining the sun protection factor, critical wavelength, UVA star rating, safety index, and UVA/UVB ratio.

The obtained results indicate that the developed hydrogels are stable systems during one year of storage in the dark at $T=4^{\circ}\text{C}$ and $T=22^{\circ}\text{C}$, with preserved structural and chemical integrity. The tested formulations exhibited satisfactory stability, promising photoprotective and biological activity, indicating their significant potential for further application in cosmetic and medical products.

Scientific
Field:

Technological engineering

Scientific
Discipline:

Materials and chemical technologies

Key Words:

green synthesis; silver nanoparticles; gold nanoparticles; plant extracts; hydrogels; biological activity; photoprotection

UDC:

546.57+546.59 615.322 544.733.432 (043.3)

CERIF
Classification:

T 350 Chemical technology and engineering

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Аутор:

Марија С. Тасић, мастер инжењер технологије

Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

Ментор:

др Драган Цветковић, редовни професор

Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

Чланови комисије:

др Ивана Нешић, редовни професор, председник

Медицински факултет у Нишу, Универзитет у Нишу

др Љиљана Станојевић, редовни професор, члан

Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

др Сања Петровић, ванредни професор, члан

Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

др Саша Савић, ванредни професор, члан

Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

Датум одбране: _____

Захвалница

Највећи део експерименталног дела ове докторске дисертације реализован је у лабораторијама Технолошког факултета у Лесковцу, Универзитета у Нишу, уз финансијску подршку Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије.

Велику захвалност дугујем проф. др Јелени Звездановић са Технолошког факултета у Лесковцу, Универзитета у Нишу, на несебичном залагању у интерпретацији и дискусији резултата течно-масенене анализе.

Захваљујем се члановима комисије: проф. др Ивани Нешић са Медицинског факултета у Нишу, проф. др Љиљани Станојевић, проф. др Сањи Петровић и проф. др Саши Савићу са Технолошког факултета у Лесковцу, на великој помоћи, корисним сугестијама и подршци током експерименталног рада и обликовања докторске дисертације.

Захваљујем се проф. др Срђану Ракићу са Природно-математичког факултета, Департмана за физику, Универзитета у Новом Саду, на великој помоћи при XRD анализи; проф. др Ђорђу Вељовићу и проф. др Наташи Обрадовић са Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду на помоћи при SEM и DLS анализама. Такође, захваљујем БиоСенс институту Универзитета у Новом Саду на омогућеном коришћењу HR SEM – Thermo Scientific Apreo 2C уређаја. Посебну захвалност дугујем проф. др Ивану Ристићу са Технолошког факултета Универзитета у Новом Саду на несебичној помоћи у организацији анализа узорака.

Захваљујем се проф. др Стеви Најману, доц. др Сањи Стојановић и проф. др Драгани Павловић са Медицинског факултета у Нишу на помоћи у експерименталном делу рада.

Дубоку и искрену захвалност дугујем свом ментору, проф. др Драгану Цветковићу, на стрпљењу, разумевању и несебичној подршци током израде ове дисертације. Његово знање, посвећеност и спремност да у сваком тренутку пружи помоћ представљали су ми велики подстрек, нарочито у најизазовнијим тренуцима.

Захваљујем свим професорима који су ме током школовања бодрили, веровали у мене и подстицали да храбро корачам напред, чак и кад је било најтеже.

Захваљујем својој породици на неизмерној подршци, разумевању и поверењу које су ми пружали током целокупног рада. Велику захвалност дугујем својим родитељима, који су увек били уз мене, пружајући ми безусловну љубав, подршку и снагу. Њихова вера у мене била је темељ на којем сам градила сваки свој успех.

Посебну захвалност дугујем својој сестри, која је увек била уз мене као подршка и ослонац, и која је безусловно веровала у мене. Хвала мом зету на великој подршци и разумевању које је пружао током овог пута. Захваљујем својој малој сестричини, Василиси, чији је осмех имао моћ да улепша и најтеже дане и подсети ме на оно што је заиста важно.

Хвала мојим пријатељима што су овај пут учинили лепшим, лакшим и испуњенијим, делећи са мном и радости и изазове које доноси бављење науком.

На крају, али не мање важно, од срца захваљујем свом супругу на бескрајном стрпљењу, разумевању и љубави. Његова подршка и вера у мене давале су ми снагу да истрајем и онда када је било најтеже.

Марија С. Пасић
(Стевановић)

СПИСАК СИМБОЛА И СКРАЋЕНИЦА

0D	нулто-димензионални наноматеријали
1D	једнодимензионални наноматеријали
2D	дводимензионални наноматеријали
3D	тродимензионални наноматеријали
A	апсорбација
A_B	апсорбација „blank”
A_C	апсорбација „контроле“
AgNO₃	сребро нитрат
AgNPs	наночестице сребра
AgNPs-E	синтетисане наночестице сребра употребом екстракта
AH	антиоксиданс који донира атом водоника
ANOVA	анализа варијансе (<i>Analysis of Variance</i>)
AuNPs	наночестице злата
AuNPs-E	синтетисане наночестице злата употребом екстракта
Blank	хидрогел без екстракта и наночестица
BSA	говеђи серумски албумин (<i>bovine serum albumin</i>)
c	брзина светлости (ms ⁻¹)
CMC	карбоксиметил-целулоза
d	параметар деконволуције
D	средња величина наночестице (nm)
DDA	дискретне диполне апроксимације
DF	степени слободе (<i>Degrees of Freedom</i>)
DLS	динамичко расејање светлости (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	Дулбеков модификовани (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	диметил сулфид
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал
EC₅₀	ефикасна концентрација која представља концентрацију екстракта која редукује 50% DPPH радикала
EDTA	етилендиаминететраоцетна киселина (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EDX	енерго-дисперзивна спектрометрија (<i>Energy-Dispersive Spectrometry</i>)

FBS	фетусни говеђи серум (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Food and Drug Administration
FNP	фабриковане наночестице (<i>fabricated nanoparticles</i>)
FT-IR	Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
FW_1	инструментално ширење
$FWHM$	ширина пика на његовој полувисини
FW_s	ширење узорка (radian)
F-однос	однос варијансе између група и варијансе унутар група
GA	гална киселина (<i>galic acid</i>)
h	Планкова константа
$H\text{AuCl}_4 \times n\text{H}_2\text{O}$	хлороауринска киселина (<i>Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate</i>)
HBSS	Ханков балансирани раствор соли (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HeLa S3	ћелије рака грлића материце код људи (<i>human cervical cancer cell line</i>)
HEPG-2	хепатоцелуларни карцином (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
HL-60	ћелијска линија људске леукемије (<i>Human Leukemia-60</i>)
I	проценат инхибиције (%)
IC	интегрисана кола
IC	инфрацрвено зрачење
ICP-OES	индуковано куплована плазма – оптичка емисиона спектроскопија (<i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i>)
ISO	Међународна организација за стандардизацију (<i>International Organization of Standardization</i>)
KBr	калијум бромид
L6	ћелијска линија скелетних мишића пацова (<i>rat skeletal muscle cell line</i>)
LC-MS	течна хроматографија – масена спектроскопија (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy</i>)
LD	лимит детекције
LPS	липополисахариди
LSPR	локализована површинска плазмонска резонанца
MDCK	Медин-Дерби псеће ћелије бубрега (<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>)
MED	минимална еритемална доза
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2-5-дифенилтетразолијум бромид
NADH	редуковани никотинамид аденин динуклеотид

OL	опсег линеарности
OS	оксидативни стрес
PAA	полиакрилна киселина
PAAM	полиакриламид
PBS	фосфатни пуферни раствор
PEG	полиетилен гликол
PEO	полиетилен оксид
PHEMA	поли-2-хидроксиетилметакрилат
PNIPAM	поли-N-изопропилакриламид
Post hoc	после тога (после анализе ANOVA)
PVA	поливинил алкохол
p-вредност	статистички показатељ вероватноће да су посматране разлике настале случајно
R	корелациони коефицијент
RAW 246.7	мишји макрофаги, неканцерогене ћелије
ROS/RNS	реактивне кисеоничне врсте/реактивне азотне врсте (<i>Reactive Oxygen Species/Reactive Nitrogen Species</i>)
SDS-HCl	натријум-додецил-сулфат - хлороводонична киселина
SEM	скенирајућа електронска микроскопија (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SPF	фактор заштите од сунчевог зрачења (<i>Sun Protection Factor</i>)
SPR	површинска плазмонска резонанца
UHPLC	течна хроматографија са ултра-високим перформансама (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
UPLC-ESI-MS	Ultra-перформансна течна хроматографија - електроспреј јонизација - масена спектрометрија (<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry</i>)
UV-Vis	ултраљубичаста-видљива спектроскопија
XRD	дифракција X-зрачења (<i>X-ray diffraction</i>)
ΔE	енергетска разлика
ζ	zeta-потенцијал
θ	угао дифракције (grad)
λ	таласна дужина (nm)
λ	таласна дужина (nm)
A_0	апсорбанција нетретираних ћелија

A549	људске ћелије плућног рака
A_s	апсорбанција узорка/третираних ћелија
E	екстракт
K	Scherrer-ова константа
K-KP	хидрогел са екстрактом купине добијеним рефлукс екстракцијом
KM 80	екстракт купине добијен мацерацијом – AuNPs синтетисане на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$
KM CT	екстракт купине добијен мацерацијом – наночестице (AgNPs и AuNPs) синтетисане на собној температури
KM TK	екстракт купине добијен мацерацијом – AgNPs синтетисане на температури кључања
KM	купина мацерација (екстракција листа купине на собној температури)
KP 80	екстракт купине добијен мацерацијом – AuNPs синтетисане на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$
KP CT	екстракт купине добијен екстракцијом уз рефлукс – наночестице (AgNPs и AuNPs) синтетисане на собној температури
KP TK	екстракт купине добијен екстракцијом уз рефлукс – AgNPs синтетисане на температури кључања
KP	купина рефлукс (екстракција листа купине на температури кључања)
MM 80	екстракт малине добијен мацерацијом – AuNPs синтетисане на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$
MM CT	екстракт малине добијен мацерацијом – наночестице (AgNPs и AuNPs) синтетисане на собној температури
MM TK	екстракт малине добијен мацерацијом – AgNPs синтетисане на температури кључања
MM	малина мацерација (екстракција листа малине на собној температури)
MP 80	екстракт малине добијен екстракцијом уз рефлукс – AuNPs синтетисане на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$
MP CT	екстракт малине добијен екстракцијом уз рефлукс – наночестице (AgNPs и AuNPs) синтетисане на собној температури
MP TK	екстракт малине добијен екстракцијом уз рефлукс – AgNPs синтетисане на температури кључања
MP	малина рефлукс (екстракција листа малине на температури кључања)
CT	собна температура
TEA	триетаноламин
TK	температура кључања
X-KM 80	хидрогел са AuNPs синтетисаним мацератом на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$

X-КМ СТ	хидрогел са наночестицама (AgNPs и AuNPs) синтетисаним мацератом на собној температури
X-КМ ТК	хидрогел са AgNPs синтетисаним мацератом на температури кључања
X-КМ	хидрогел са екстрактом купине добијеним мацерацијом
X-КР 80	хидрогел са AuNPs синтетисаним екстрактом уз рефлукс на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$
X-КР СТ	хидрогел са наночестицама (AgNPs и AuNPs) синтетисаним екстрактом уз рефлукс на собној температури
X-КР ТК	хидрогел са AgNPs синтетисаним екстрактом уз рефлукс на температури кључања



1 УВОД.....	1
2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО.....	4
2.1 Наноматеријали	5
2.2 Наночестице.....	6
2.2.1 Структура и особине наночестица метала	7
2.2.2 Наночестице сребра	12
2.2.3 Наночестице злата	14
2.3 Екстракти биљака као редукциона средства	15
2.3.1 Методе екстракције	15
2.3.2 Биљни материјал.....	17
2.4 Биосинтеза наночестица метала.....	22
2.5 Методе анализе и карактеризације екстраката и наночестица метала.....	24
2.5.1 Течна хроматографија – масена спектрометрија (LC-MS).....	24
2.5.2 Електронска (UV-Vis) спектрофотометрија	26
2.5.3 Инфрацрвена спектрофотометрија са Фуријеовом трансформацијом (FT-IR).....	28
2.5.4 Дифракција X-зрака (XRD)	29
2.5.5. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)	32
2.5.6 Енерго-дисперзивна спектрометрија (EDX).....	33
2.5.7 Динамичко расејање светлости (DLS) и zeta-потенцијал.....	35
2.6 Биолошка активност екстраката и наночестица метала	38
2.6.1 Антиоксидативна активност – DPPH тест	38
2.6.2 Антибактеријска активност наночестица метала	40
2.6.3 <i>In vitro</i> цитотоксична активност наночестица метала	43
2.6.4 <i>In vitro</i> анти-инфламаторна активност наночестица метала	45
2.6.5 Фактор заштите од сунца (SPF)	46
2.7 Хидрогелови	49
2.7.1 Типови хидрогелова	49
2.7.2 Механизми настанка хидрогелова	50
2.7.3 Особине хидрогелова	51
2.7.4 Примена хидрогелова у медицини	54
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	58
3.1 Материјал и прибор.....	58
3.1.1 Биљни материјал.....	59

3.2 Екстракција	59
3.2.1 Мацерација.....	59
3.2.2 Екстракција уз рефлукс.....	60
3.3 Индуковано куплована плазма – оптичка емисиона спектроскопија (ICP-OES)...	60
3.4 Течна хроматографија – масена спектрометрија (UHPLC-MS/ESI).....	62
3.5 Синтеза наночестица сребра и злата	63
3.5.1 Синтеза наночестица сребра	63
3.5.2 Синтеза наночестица злата.....	64
3.6 Инструменталне методе карактеризације наночестица сребра и злата	64
3.6.1 UV-Vis спектрофотометрија наночестица сребра и злата.....	64
3.6.2 FT-IR спектрофотометрија наночестица сребра и злата	64
3.6.3 XRD анализа наночестица сребра и злата.....	65
3.6.4 SEM микроскопија наночестица сребра и злата	65
3.6.5 EDX анализа наночестица сребра и злата.....	65
3.6.6 DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица сребра и злата.....	65
3.7 Припрема хидрогелова са наночестицама сребра и злата.....	65
3.8 Физичко-хемијска карактеризација хидрогелова.....	66
3.9 Биолошка активност.....	67
3.9.1 Антиоксидативна активност – DPPH тест	67
3.9.2 Антибактеријска активност екстраката и наночестица сребра и злата.....	68
3.9.3 <i>In vitro</i> тестирање цитотоксичности наночестица сребра	69
3.9.4 <i>In vitro</i> анти-инфламаторна активност хидрогелова	70
3.9.5 Фактор заштите од сунчевог зрачења (SPF) и UV параметри хидрогелова	71
4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	73
4.1 Синтеза и карактеризација наночестица сребра.....	73
4.1.1 UV-Vis спектрофотометрија екстраката и наночестица сребра	73
4.1.2 FT-IR спектрофотометрија екстраката и наночестица сребра	84
4.1.3 XRD анализа наночестица сребра.....	89
4.1.4 SEM анализа наночестица сребра.....	92
4.1.5 EDX анализа наночестица сребра.....	94
4.1.6 DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица сребра.....	101
4.1.7 UHPLC-MS анализа екстраката и наночестица сребра	104
4.2 Синтеза и карактеризација наночестица злата	109
4.2.1 UV-Vis спектрофотометрија екстраката и наночестица злата.....	109

4.2.2 FT-IR спектрофотометрија екстраката и наночестица злата	115
4.2.3 XRD анализа наночестица злата	117
4.2.4 SEM анализа наночестица злата	119
4.2.5 EDX анализа наночестица злата	121
4.2.6 DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица злата	124
4.3 Биолошка активност синтетисаних наночестица сребра и злата	127
4.3.1 Антиоксидативна активност.....	127
4.3.2 Антимикробна активност	134
4.3.3 Цитотоксична активност наночестица сребра <i>in vitro</i>	141
4.4 Формулације хидрогелова са наночестицама сребра и злата	143
4.4.1 Физичко-хемијске карактеристике хидрогелова са наночестицама сребра ..	143
4.4.2 Физичко-хемијске карактеристике хидрогелова са наночестицама злата.....	163
4.4.3 Стабилност хидрогелова са наночестицама сребра и злата	176
4.4.4 Органолептичке карактеристике хидрогелова	184
4.5 Биолошка активност хидрогелова	188
4.5.1 Антиоксидативна активност хидрогелова са наночестицама сребра.....	188
4.5.2 Антиоксидативна активност хидрогелова са наночестицама злата	191
4.5.3 Анти-инфламаторна активност хидрогелова <i>in vitro</i>	193
4.6 Фотопротективни потенцијал хидрогелова	196
4.6.1 Фотопротективни потенцијал хидрогелова са наночестицама сребра.....	196
4.6.2 Фотопротективни потенцијал хидрогелова са наночестицама злата	198
5 ЗАКЉУЧАК	201
6 ЛИТЕРАТУРА	212
7 ПРИЛОГ	257
БИОГРАФИЈА.....	269
БИБЛИОГРАФИЈА	270



1 УВОД

Развој нанотехнологије представља значајно достигнуће савремене науке које омогућава контролу материје на нивоу од 1 до 100 nm и производњу материјала са јединственим физичким, хемијским и биолошким својствима. Посебно место у овој области заузимају наночестице метала, међу којима се истичу наночестице сребра (AgNPs) и злата (AuNPs), захваљујући својој израженој површинској реактивности, оптичким својствима условљеним површинском плазмонском резонанцом, као и значајним биолошким активностима. Контролисана синтеза, стабилизација и функционализација ових честица омогућавају добијање материјала са прецизно дефинисаним карактеристикама, што их чини погодним за примену у медицини, фармацији, ткивном инжењерству и развоју напредних терапијских система.

Иако је концепт нанотехнологије формулисан тек у другој половини XX века, употреба наночестица метала присутна је знатно раније. Колоритни ефекти колоидног злата и сребра коришћени су у изради витража у средњовековној Европи, док је колоидно сребро имало примену у традиционалној медицини као антимикробно средство. Савремена научна основа за разумевање понашања наночестица постављена је развојем колоидне хемије, а посебно радовима који су дефинисали механизме формирања, стабилизације и агрегације честица у дисперзним системима. Данас су наночестице сребра и злата предмет интензивних истраживања услед изражене антимикробне активности (AgNPs), биокомпатибилности и површинске функционализације (AuNPs), као и могућности њихове примене у дијагностици, контролисаној испоруци лекова и регенеративној медицини.

Традиционалне методе синтезе наночестица метала често подразумевају употребу токсичних редукционих агенаса и стабилизатора што може ограничити њихову биомедицинску примену. У том контексту, „зелена“ синтеза наночестица, заснована на употреби биомолекула и биљних екстраката, представља еколошки прихватљиву и одрживу алтернативу. Биомолекули као што су протеини, полифеноли, флавоноиди, шећери и органске киселине могу истовремено деловати као редукциони и стабилизациони („капинг“) агенси, омогућавајући контролу величине, морфологије и површинских својстава добијених наночестица. Поред тога, присуство биолошки активних молекула на површини честица може допринети њиховој појачаној антимикробној, антиоксидативној и цитотоксичној активности. Сама техника синтезе,



али и свеобухватна физичко-хемијска карактеризација наночестица, представља неопходан предуслов за разумевање њиховог понашања у биолошким системима. Параметри као што су величина и расподела величина, морфологија, површинско наелектрисање, кристалност и стабилност у колоидним системима, директно утичу на испољавање биолошке активности. Интеграција спектроскопских, микроскопских и дифракционих метода анализе омогућава корелацију између структурних карактеристика и функционалних својстава добијених наночестица.

Биолошке активности наночестица сребра и злата обухватају, пре свега, антимикубно, антиоксидативно и потенцијално цитотоксично дејство, при чему је неопходно прецизно дефинисати границу између терапијског ефекта и нежељене токсичности. Управо зато, систематско испитивање биолошких активности у контролисаним условима представља основу за процену њихове безбедности и применљивости у формулацијама намењеним директном контакту са ткивима. Инкорпорација наночестица у полимерне матрице, нарочито у хидрогелове, отвара нове могућности у развоју функционалних биоматеријала. Хидрогелови представљају тродимензионалне хидрофилне полимерне мреже са способношћу задржавања значајних количина воде, што им обезбеђује биомиметичка својства слична екстрацелуларном матриксу. Ове карактеристике чине их погодним носачима за топикалну примену, ткивно инжењерство, третман рана и системе контролисане испоруке биоактивних компоненти. Додавањем наночестица сребра и злата могуће је унапредити механичка, антимикубна и функционална својства хидрогелова, уз потенцијално очување биокомпатибилности система.

Полазећи од претходно изложених чињеница, формулисани су циљеви ове докторске дисертације:

- синтеза наночестица сребра и злата употребом водених екстраката биљака као извора редукционих и стабилизационих агенаса;
- детаљна физичко-хемијска карактеризација добијених наночестица;
- провера биолошке активности синтетисаних наночестица са аспекта потенцијалне примене у биоматеријалима;
- припрема и карактеризација топикалних хидрогелова са синтетисаним наночестицама, уз процену њихових механичких и биолошких својстава, у циљу добијања функционалних материјала са унапређеним апликативним својствима.



Оваквим приступом настоји се допринети развоју „зелених“ метода синтезе одрживих наноматеријала и њиховој примени у савременим биомедицинским и фармацеутским технологијама.



2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО

У далекој прошлости, нанотехнологија се примењивала а да тога људи нису ни били свесни. Још у старом Египту, за фарбање косе коришћена је црна боја за коју се сматрало да је биљног порекла, док је касније утврђено да потиче од пасте на бази воде, креча и оксида олова, при чему долази до формирања наночестица галенита (олово-сулфида). Пример древне примене нанотехнологије у старом Риму представља Ликургова шоља (4. век нове ере). Ова шоља испољава необична оптичка својства, односно мења боју у зависности од положаја извора светлости: при рефлектованој светлости била је зелене боје, док је при пропуштеној светлости постајала црвена. Каснијим истраживањем дошло се до закључка да шоља садржи наночестице сребра и злата, величине 50 – 100 nm. До овог ефекта долази због плазмонског побуђивања електрона (Joudeh and Linke, 2022). Термин нанотехнологија је први пут уведен још давне 1974. године, од стране Norio Taniguchi-а, а реч „нано“ потиче од грчке речи „*nanos*“ што значи патуљак (Baranwal et al., 2016).

У данашње време, нанотехнологија представља једну од најбрже растућих и најзахтевнијих грана у области науке и инжењерства. Она се бави проучавањем материјала који испољавају значајно измењена својства у поређењу са материјалима већих димензија (Santhoshkumar et al., 2017). Нанотехнологија интегрише концепте из физике, хемије и науке о материјалима ради објашњења јединственог понашања материјала на наноразмери (Sanders et al., 2019). Разлике у структурним и физичким својствима атома и молекула елемента које утичу на особине наноматеријала су последица физичко-хемијских карактеристика и односа површине и запремине (Santhoshkumar et al., 2017).

Нанотехнологија игра веома битну улогу у здравству. У области биомедицине се јављају захтеви за развој иновација у очувању здравља, па се самим тим развијају наноуређаји. Нанонаука се углавном бави проучавањем морфолошких и хемијских особина супстанци на скали од 10^{-9} m; материјали се називају наноматеријалима, а честице наночестицама (Nithin et al., 2023).



2.1 Наноматеријали

У нанотехнологији кључну улогу имају наноматеријали који се дефинишу као материјали са најмање једном димензијом на наноскали (мањом од 100 nm). Они се примењују у широком спектру комерцијалних производа. Фабриковане наночестице (*fabricated nanoparticles*, FNP) присутне су у козметици, производима за личну хигијену, храни, амбалажи, одећи, детерџентима и многим другим производима (Zhang et al., 2015). Додатни примери укључују угљеничне наноцеви, шупље цилиндричне структуре сачињене од угљеника, које се користе у полимерним композитима, електромагнетној заштити, емитерима електронског поља (плоснати екрани), суперкондензаторима, батеријама, за складиштење водоника и у структурним материјалима. Проводне и полупроводничке наножице, пречника неколико десетина нанометара, користе се као интерконектори у наноелектронским уређајима (Aitken et al., 2006). Значајан напредак остварен је у индустрији полупроводника захваљујући нанотехнологији. Рецимо, мобилни телефони су еволуирали у мултифункционалне уређаје захваљујући употреби наноматеријала (Kaiser and Quertz, 2008). Савремени телефони омогућавају слање текстуалних порука, снимање и дељење слика, покретање интернет апликација, слушање музике, играње игрица и гледање филмова захваљујући све снажнијим компјутерским чиповима, тј. развој рачунара постао је могућ уз минијатуризацију компоненти употребом наноматеријала. Почетак развоја интегрисаних кола (IC) везује се за Џека Килбија (Jack Kilby, Texas Instruments) и Роберта Ноицеа (Robert Noyce, Fairchild Semiconductor), који су крајем 1950-их развили прво интегрисано коло (Sanders, 2019). Компанија Fairchild је 1961. применила процес фотојеткања (хладног гравирања) за израду великог броја транзистора на танком слоју силицијума с величинама компоненти од 5 μm (Madou, 2011). До 1970-их, Intel микропроцесори већ су садржали 2300 транзистора (El-Aawar, 2015). Нови приступи у овој области усмерени су на економичне и ефикасне методе за синтезу и контролу наноматеријала на атомском нивоу (Santhoshkumar et al., 2017).

У поређењу са конвенционалним материјалима, наноматеријали нуде бројне предности, пре свега специфичну геометријску структуру и високо развијену површину (Santhoshkumar et al., 2017; Pokropivny et al., 2007; Mekuye and Abera, 2023). Њихова физичка, хемијска и биолошка својства значајно се разликују од својстава макроматеријала, што је последица њихове мале величине и великог односа површине



и запремине. Управо ова смањена величина доводи до промене укупне енергије система, утичући на његову термодинамичку стабилност.

Наноматеријали се могу класификовати на основу броја димензија у којима се налазе у наноскали (Asha and Narain, 2020; Joudeh and Linke, 2022) као:

- Нулто-димензионални (0D): све три димензије су на наноскали. Примери: квантне тачке, фулерени, наночестице.
- Једнодимензионални (1D): само једна димензија је на наноскали, остале су на наноскали. Примери: наноцеви, нановлакна, наножице, наноштапићи, нанорогови.
- Дводимензионални (2D): две димензије су на наноскали, једна на наноскали. Примери: наноплоче, нанофилмови, нанослојеви.
- Тродимензионални (3D): све три просторне димензије су веће од наноскале, али су изграђени од нано- структурних јединица. Ова група обухвата расуте наноматеријале, као што су прахови, дисперзије наночестица, низови наноцеви и наножица.

2.2 Наночестице

Међународна организација за стандардизацију (*International Organization for Standardization*, ISO) дефинише наночестице као нанообјекте код којих су све спољне димензије на наноскали, при чему се дужине најдуже и најкраће осе не разликују значајно. Оне могу бити природног, случајног (споредног) или вештачког порекла, а карактерише их то што 50% или више честица има димензије у области од 1 nm до 100 nm (Mathur et al., 2017). Уколико се димензије осе значајно разликују (обично више од три пута), уместо термина „наночестице“ користе се термини као што су нанообјекти где поред наночестица спадају наноплоче и нановлакна. Ако је величина испод 1 nm, најчешће се користи израз атомски кластери.

Наночестице могу имати различите облике – сферне, цилиндричне, конусне, цевасте, спиралне, са шупљим језгром или неправилне. Могу бити кристалне (монокристалне или поликристалне), аморфне, растресите или агломерисане (Joudeh and Linke, 2022).

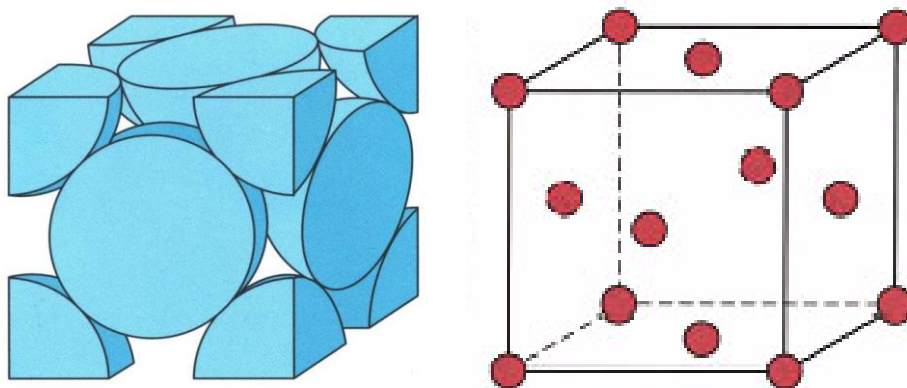
Наночестице се могу класификовати према саставу на (Ealias and Saravanakumar, 2017):



- Органске – изграђене од протеина, угљених хидрата, липида, полимера и других органских једињења. У ову групу спадају мицеле, липозоми, дендримери, протеински комплекси. Ове наночестице су осетљиве на топлоту и електромагнетно зрачење.
- Неорганске – направљене од метала, керамике или полупроводничких материјала. Имају изразита оптичка, електрична, термичка, магнетна и биолошка својства.
- Наночестице на бази угљеника – изграђене искључиво од атома угљеника. Примери су фулерени, угљенична чађ и угљеничне квантне тачке. Карактеришу их висока електрична проводљивост, механичка чврстоћа, афинитет према електронима, као и изражена оптичка, термичка и сорпциона својства. Примена укључује испоруку лекова, складиштење енергије, фотонапонске уређаје, детекцију патогена и сл.

2.2.1 Структура и особине наночестица метала

Формирање кристалне структуре наночестица метала настаје повезивањем атома или молекула у правилан распоред унутар кристалне решетке (Poole and Owen, 2003). Већина метала у чврстом стању формира густо упаковане кристалне решетке. Такав случај је са металима као што су Ag, Al, Au, Co, Cu, Pb, Pt и Rh, који кристалишу у форми површински центриране кубне (*face-centered cubic*, FCC) решетке. Атоми се налазе на сваком углу (рогљу) и центрима свих страница. Само једна осмина сваког атома у углу лица ћелије и једна половина атома у центру лица ћелије припада јединичној ћелији као што се види на слици 1. Елементарна ћелија дакле садржи 4 атома ($8/8 + 6/2 = 1 + 3 = 4$), а координациони број (најближи атоми посматраног атома) износи 12.



Слика 1. Два начина приказивања површински центриране кубне решетке кристала

У кристалној решетки, атоми се налазе на одређеним положајима, али непрестано флукутирају у близини тих места услед топлотне енергије. Те флукутације постају израженије при вишим температурама. Пошто су атоми повезани хемијским везама, вибрирање једног атома око његовог равнотежног положаја изазива реакцију суседних атома. У том смислу, хемијске везе се понашају као опруге које се растежу и сабијају током осцилаторног кретања. Као резултат тога, многи атоми вибрирају усклађено, а ово колективно кретање се шири целом кристалном решетком (Poole and Owen, 2003).

Због својих малих димензија, наночестице имају велики удео површинских атома у односу на укупну запремину, што доводи до значајних промена у физичким и хемијским особинама материјала. Дакле, смањење величине честица на нано-димензије повећава однос површине и запремине честица, што резултира већим бројем реактивних површинских места. Такви материјали испољавају већу реактивност у односу на материјале у макроскопским размерима. Мање честице су стабилније и координисаније, са већим бројем доступних веза у унутрашњости материјала, што доприноси и већој просечној енергији везивања по атому (Asha et al., 2020).

Механичке особине наночестица

Механичке особине представљају механичке карактеристике материјала под различитим условима, окружењима и различитим спољашњим силама. У механичке особине наночестица убрајају се тврдоћа, кртост, чврстоћа, жилавост, отпорност на замор, пластичност, еластичност, дуктилност, крутост и граница течења.



Тврдоћа материјала се повећава како се величина честице смањује у нанофазну област. Термичка стабилност показује да нанокристални метали показују раст честица на релативно ниским температурама жарења. Слична побољшања чврстоће и тврдоће показали су метали са површински центрираном кубном решетком који су тестирани на затезање, уз појаву ограничене дуктилности. Ова појава може произићи из тешкоћа у настанку, умножавању и кретању дислокација, а такође и из присуства значајне количине дефеката у структури оваквих материјала (Kestell et al., 2010).

Физичке особине наночестица

Термалне особине наночестица зависе од електронске и фотонске проводљивости, а самим тим и од расејања које их прати. Ове особине обухватају топлотну проводљивост, топлотни капацитет, термичку стабилност и термоелектричну снагу (Joudeh and Linke, 2022).

На особине наночестица значајно утичу и квантни ефекти, посебно ефекат квантног ограничења. Он се односи на промене у електронским особинама честица услед смањених димензија, као што су промене у енергетским нивоима, валентним и проводним зонама, као и величини енергетских разлика. Овај ефекат постаје изражен када су димензије наночестице упоредиве са таласном дужином светлости коју емитују електрони при релаксацији, што доводи до промене електронске структуре и појаве егзотичних, локализованих електронских стања (Asha et al., 2020).

Једно од важних својстава наночестица је површинско наелектрисање. Оно утиче на стабилност, агрегацију и интеракцију са окружењем и функционалним групама (Medici et al., 2021). Приликом уношења честице у водени медијум долази до појаве протонације или депротонације на површини, чиме се формира електрични двојни слој. Катјони се акумулирају, док анјони мигрирају, што доводи до електростатичког потенцијала између површине честице и суспензионе течности. Овај потенцијал је познат као zeta (ζ) потенцијал и представља меру електростатичког одбијања између честица у дисперзији. Виши zeta-потенцијал значи већу колоидну стабилност и мању склоност ка агрегацији. На вредност zeta-потенцијала утичу бројни фактори: величина честица, хемијски састав и рН вредност раствора (Lowry et al., 2016; Kumar and Dixit, 2017).

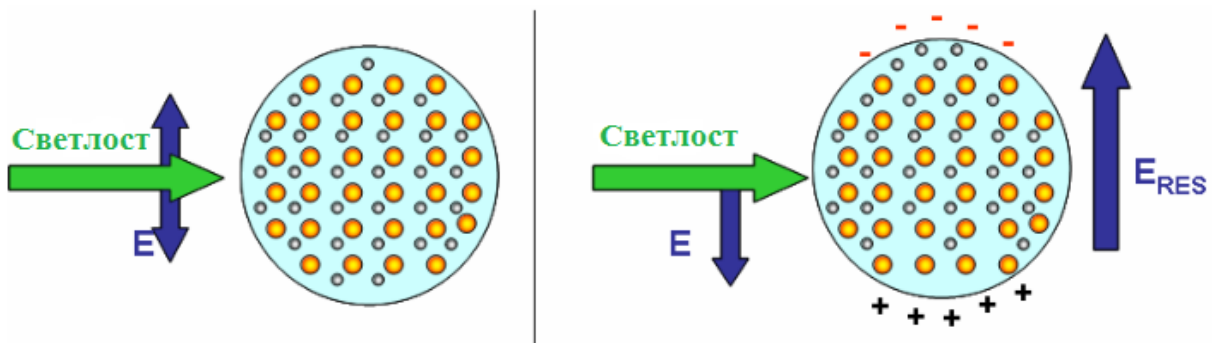
Због високе површинске енергије, наноматеријали често испољавају повећану хемијску реактивност, али и смањену термодинамичку и колоидну стабилност. Велики удео незасићених површинских атома доводи до већег броја „отворених“ хемијских веза



(*dangling bonds* - висућних веза), односно оних веза које нису у потпуности засићене и, самим тим, веће површинске енергије (Asha et al., 2020). Ове површине теже смањењу енергије интеракцијом са јонима или молекулима из околине.

Оптичке карактеристике наноматеријала – рефлексија, апсорпција, емисија и трансмисија светлости, зависе од електронске структуре, која се мења у зависности од морфологије честица. Квантни ефекти, као и површинска плазмонска резонанца (*surface plasmon resonance*, SPR), значајно утичу на ове особине (Asha et al., 2020; Wang et al., 2020). Када електрон прелази са вишег на ниже енергетско стање, емитује фотон таласне дужине $\lambda = hc/\Delta E$. Већа енергетска разлика (ΔE) доводи до емисије фотона краће таласне дужине, што узрокује „померај ка плавом“ делу спектра.

Површинска плазмонска резонанца представља једно од најистакнутијих оптичких својстава наночестица метала. Овај феномен представља колективне осцилације проводних електрона побуђених електромагнетним пољем светлости. Код наночестица метала осцилације електрона индукују електромагнетно поље око честице (сл. 2), које може бити много веће од поља упадне светлости (Garcia, 2011, Bednar, 2014).

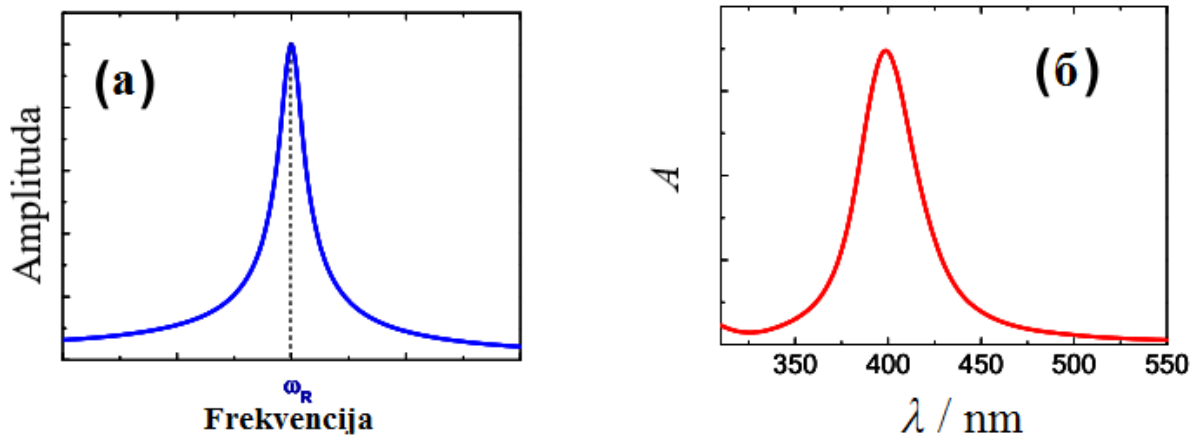


Слика 2. Шема интеракције светлости са наночестицом метала (Garcia, 2011)

Уколико се величина честице метала смањи на опсег нанометара, оптичка својства се драматично модификују настанком површинског плазмона (SP), а њено даље понашање је потпуно другачије од понашања метала у расутом стању. Пошто су електрони затворени унутар наночестице, негативно наелектрисање ће се акумулирати на једној, а позитивно на супротној страни, стварајући електрични дипол. Овај дипол доводи до генерисања електричног поља унутар честице, супротног пољу светлости, које утиче на електроне да се врате у равнотежни положај. Како се енергија мора очувати, повећање енергије мора бити обезбеђено упадном светлошћу. Упадна светлост се делимично гаси (апсорбује) када дође до побуђивања SP у честици. Дакле, што су веће осцилације



електрона, већа је апсорпција светлости, тако да оптички апсорпциони спектар омогућава детекцију побуђивања SP. Резонантна фреквенција за осцилације у наночестицама метала одговара UV-Vis светлости, тако да SP апсорпционе траке настају у овом делу спектра (сл. 3) (Garcia, 2011).



Слика 3. Амплитуда осцилације линеарног осцилатора као функција фреквенције спољашње силе (а), и оптички апсорпциони спектар који одговара наночестицама сребра од 10 nm уграђеним у силицијумско стакло (б) (Garcia, 2011)

Код полупроводничких наноматеријала, апсорпција и емисија светлости се јављају на специфичним таласним дужинама, које зависе од величине и облика честица. Ово омогућава прецизно подешавање емисионе таласне дужине од ултраљубичасте до инфрацрвене области (Asha et al., 2020).

Наноматеријали такође показују јединствена магнетна својства. Због високог односа површине и запремине, атоми у наночестицама испољавају другачије магнетно спрезање у односу на материјале у расутом стању, што доводи до необичног магнетног понашања (Asha et al., 2020; Mekuye and Abera, 2023). Величина и облик наночестица представљају два битна параметра за њихове магнетне особине. То значи да смањењем величине честица долази до смањења енергије магнетне анизотопије по наночестици. Ова енергија описује енергију која одржава магнетни момент у одређеној оријентацији. Наиме, при карактеристичној величини за сваки тип наночестица, енергија анизотопије постаје једнака тоplotној енергији, што дозвољава случајно окретање магнетног момента. Утицај величине наночестица на магнетне особине може се приметити и у променама магнетизације код магнетних материјала (Joudeh and Linke, 2022).



2.2.2 Наночестице сребра

Сребро је блистав, веома дуктилан (мек, истегљив) и савитљив елемент, мало тврђи од злата, са симболом Ag (лат. *Argentum*) и атомским бројем 47. Један је од основних елемената који чине нашу планету. У природи постоји као природни елемент, као легура која се комбинује са другим металима (нпр. златом) и у облику минерала (нпр. хлораргирит и аргентит) (Keat et al., 2015). Наночестице сребра (AgNP) имају изузетна физичко-хемијска својства, што их чини корисним у пољопривреди, медицини, прехранбеној индустрији и амбалажи. Њихова способност да производе реактивне врсте кисеоника и слободне радикале омогућава им да делују антимикуробно, тј. да уништавају микробне ћелије и смањују њихову репликацију (Tang and Zheng, 2018). Поред тога, одликују се добрим оптичким карактеристикама, што их чини погодним за примену у сензорима, катализи и као плазмонски супстрати. Њихова локализована површинска плазмонска резонанца (LSPR) омогућава потенцијалну употребу у дизајну логичких капија, чак и у криптографији (Kshtriya et al., 2021). Трака површинске плазмонске резонанце јавља се на ~405 nm у UV-Vis спектру (Joudeh and Linke, 2022).

У формирању наночестица сребра користе се два приступа, top-down и bottom-up. Први приступ обухвата разбијање већег материјала на наночестице уз коришћење техника ласерске аблације и распршивања. Приступ bottom-up подразумева формирање наночестица коришћењем мањих ентитета као што су хемијске и биолошке методе (Alharbi et al., 2022).

Физичка метода синтезе наночестице сребра (ласерска аблација) укључује синтезу AgNPs у раствору. Ова метода зависи од различитих фактора који утичу на њену ефикасност, као што су таласна дужина ласера, период ласерских импулса, време аблације, ефикасан течни медијум (са сурфактантима или без њиховог присуства) и снага ласера. Ови фактори такође утичу и на карактеристике наночестица сребра. Ласерска аблација представља јединствену и значајну методу јер производи чисте наночестице метала, без употребе хемијских реагенаса у раствору (Beuene et al., 2017).

За хемијски приступ синтезе наночестица потребни су алати који су лако доступни и мање компликовани. Кључну улогу у овој методи игра редукционо средство за претварање јона сребра у метално стање. Контрола величине и затварање (стабилизовање) могу се постићи уз коришћење поливинилпиролидона, а стабилизација наночестица врши се уз помоћ натријум борохидрида и тринатријум цитрата. Ове



хемикалије, као и друге које се користе у производњи наночестица сребра представљају изузетно скупе и опасне супстанце. Упоредо са хемијском синтезом наночестица сребра настаје много нуспроизвода који могу бити штетни и отровни. Међутим, главна предност ове методе синтезе је синтеза наночестица сребра са унапред дефинисаним обликом и дефинисаном величином (Hossain et al., 2022).

Биолошке („зелене“) методе синтезе наночестица сребра подразумевају производњу наночестица уз коришћење биолошких ентитета као што су биолошки агенси (протеини, ензими, полисахариди и њихови деривати), биљке и микробни агенси. Биљке и микроорганизми (бактерије, алге, гљивице, квасци) представљају изворе ефикасних биолошких стабилизатора у формирању наночестица. Зелена или еколошка синтеза избегава многе штетне супстанце и подразумева синтезу при благом притиску, температури, рН вредности, уз знатно нижу цену (Alharbi et al., 2022; Salem and Fouda, 2020; Beyene et al., 2017).

На вишим температурама синтезе брзина редукције се повећава, већина атома сребра користи се за нуклеацију, тако да настају честице мањих димензија, док се на нижим температурама производе наночестице већих димензија (Karušćićska and Nowak, 2016). У синтези наночестица сребра коришћењем бактерија и гљивица као стабилизационих агенаса, микроорганизми користе редокс мембранске протеине за површинску синтезу и екстрацелуларне ензиме за синтезу (Dawadi et al., 2021). Полисахариди и њихови деривати (карбоксиметил декстран и декстрансулфат) имају способност да редукују јоне сребра и користе се као редукциони агенси у формирању и стабилизацији наночестица сребра (Глишић, 2017). Такође, у биолошкој синтези се као редукциони агенси користе и биљни изолати, пре свега њихови екстракти који могу бити припремљени од различитих делова биљке (корен, лист, стабло, цвет, плод, надземни део, семе) (Čakić et al., 2018; Stevanović et al., 2019; Eker et al., 2025; Arshad et al., 2024). Екстракти који се користе у синтези и стабилизацији наночестица могу се припремати у различитим облицима и уз примену различитих растварача, у зависности од врсте биљног материјала и циљаних својстава добијених наночестица. Биљни материјал се може користити у облику праха или уситњеног ткива, након чега се екстракција најчешће спроводи коришћењем воде, етанола, водено-етанолних смеша или метанола (Huq et al., 2022; Parthiban et al., 2018; Heidari et al., 2018; Wirwis and Sadowski, 2023; Chirumamilla et al., 2022).



2.2.3 Наночестице злата

Злато је густ, мекан, сјајан и кован метал, са симболом Au (лат. *Aurum*) и атомским бројем 79 у периодном систему хемијских елемената. Један је од најмање реактивних хемијских елемената, и често се јавља у слободном, елементарном облику, у виду грумења или зрна у стенама, тј. жицама. Особине наночестица злата (AuNP) разликују се од њиховог расутог облика, јер је расуто злато чврста супстанца жуте боје, инертне природе. Наночестице злата показују и различите облике као што су сферни, субоктаедарски, октаедарски, декаедарски, икосаедарски вишеструко увијени, неправилан облик, тетраедарски, нанотроугласти, облик нанопризме, хексагоналне плочице и наноштапића (Bharadwaj et al., 2021; Dreaden et al., 2012). Интеракције између наночестица злата, као и склапање мрежа наночестица, играју кључну улогу у одређивању њихових особина (Khan et al., 2014). Наночестице злата имају јединствена физичко-хемијска својства захваљујући великој површини у односу на запремину, површинској плазмонској резонанци, могућности да се функционализују на више начина, једноставном начину добијања и доброј стабилности. Осим тога, одликују се високом биокомпатибилношћу и ниском токсичношћу за људске ћелије (Kshtriya et al., 2021). На UV-Vis спектру јавља се трака површинске плазмонске резонанце на таласној дужини ~520 nm (Amendola et al., 2017).

Као и у случају наночестица сребра, и код синтезе наночестица злата се користе два приступа – top-down и bottom-up, док синтеза подразумева примену физичких, хемијских и биолошких метода (Vijayaram et al., 2024).

У физичке методе продукције наночестица спадају методе γ -зрачења, микроталасног зрачења, сонохемијска метода, ласерска аблација, термолитички процес, фотохемијски процес, ултравиолетно зрачење, док употреба γ -зрачења омогућава контролисану величину и високу чистоћу наночестица. Ласерска аблација се користи за формирање наночестица злата са жељеним (подесивим) карактеристикама (Elahi et al., 2018).

Хемијске методе продукције наночестица подразумевају хемијске реакције које се изводе у воденој средини уз коришћење редукционог агенса. Као уобичајена средства која се користе за стабилизацију наночестица злата су натријум борхидрид и натријум цитрат. Овом методом се добијају наночестице сферног облика са уском расподелом величина (Elahi et al., 2018). Недостатак физичке и хемијске методе је ниска стабилност синтетисаних наночестица злата и њихова агрегација честица (Mikhailova, 2021).



Формирање наночестица злата зеленом методом синтезе је лако и једноставно јер се наночестице могу производити у умереним условима, без употребе повишених температура и притисака. Биосинтеза се одвија у два корака: Au^{3+} се редукује до Au^0 , и након тога агрегација и стабилизација резултирају формирањем релативно стабилних наночестица злата (Mikhailova, 2021). Промена боје из црвене у љубичасту знак је успешне производње наночестица злата. У биолошке материјале који се користе за синтезу спадају биљке, микроорганизми, ензими, полисахариди и др (Lee et al., 2020). Као и код синтезе наночестица сребра, и код синтезе наночестица злата користе се различити делови биљака, укључујући листове, стабљике, корен, цветове и коре, а екстракти се могу припремати у облику водених, етанолних, метанолних или мешаних водено-органичких растварача, као и од сувог или свеже уситњеног биљног материјала. Ови екстракти садрже полифеноле, флавоноиде, танине, алкалоиде, протеине и полисахариде, који омогућавају биоредукцију Au^{3+} јона и стабилизацију насталих наночестица, спречавајући агрегацију и обезбеђујући контролу величине и морфологије наночестица (Mittal et al., 2013; Marslin et al., 2018). Због својих еколошких и економских предности, као и могућности добијања наночестица различитих величина и облика при благим реакционим условима, биљни екстракти представљају један од најчешће коришћених биолошких материјала у зеленим приступима синтезе наночестица злата (Ortiz et al., 2023; Santhos et al., 2022; Abdellatif et al., 2023; Ramírez et al., 2025).

2.3 Екстракти биљака као редукциона средства

2.3.1 Методе екстракције

Екстракција представља процес издвајања лековитих и активних компонената из биљних (или животињских) ткива помоћу одговарајућих, селективних растварача. Овом методом добијају се производи који садрже растворљиве биљне метаболите у облику сложених смеша, као течности, получврсте масе или у виду праха, и користе се за оралну или спољашњу примену (Handa et al., 2008). У многим случајевима, екстракција се показала као ефикаснија, селективнија и економичнија метода у поређењу са другим поступцима издвајања активних принципа, као што су дестилација, испаравање или мембранске технологије.



Избор растварача игра кључну улогу у екстракционом процесу будући да управо он омогућава ослобађање вредних активних једињења из биљних материјала. У зависности од физичко-хемијских особина фаза које учествују у процесу екстракција се дели на два основна типа:

- екстракција чврсто-течно,
- екстракција течност-течно.

Екстракција чврсто-течно

Ова метода подразумева издвајање растворљивих компоненти из чврстог биљног материјала помоћу растварача, при чему долази до преноса масе из чврсте фазе у течну. Као растварачи се могу користити вода, органски растварачи или раствори киселина, база и соли. Метода се користи за добијање концентрованих раствора биоактивних супстанци, а њена успешност зависи од више фактора, као што су: природа биљног материјала, величина честица, садржај влаге, степен самлевености, концентрација активних супстанци у узорку и сл. (Veljković and Milenović, 2002; Coulson et al., 1991; Stanković and Stanojević, 2014).

Једна од често примењиваних метода је мацерација, која подразумева уситњавање биљног материјала ради повећања површине контакта са растварачем. Тако припремљен материјал потапа се у изабрани растварач у затвореном суду, а повремено мешање омогућава бољу дифузију и замену засићеног растварача свежим, чиме се повећава укупан принос екстракције. Процес се завршава када се успостави равнотежа концентрација растворених супстанци између биљног материјала и растварача (Azmir et al., 2013).

Екстракција уз рефлукс представља процес екстракције применом испарљивих органских растварача (нпр. етанол), за екстракцију компоненти из биљних сировина на повишеним температурама. Систем се загрева до тачке кључања растварача, долази до кондензације испарљивог растварача који се потом враћа у посуду за екстракцију у циљу поновљеног натапања сировине. Ова врста екстракције побољшава брзину екстракције и смањује потрошњу растварача. Главни фактори који утичу на ефикасност ове екстракције су однос биљног материјала и растварача, време екстракције и концентрација органских растварача (Zhang et al., 2023).



2.3.2 Биљни материјал

Као одговор на постављени циљ зелене синтезе, водени екстракти листова биљака су коришћени као редукциона средства у синтези наночестица сребра и злата у овом раду. За изворе екстракта одабране су биљке из исте породице које се широко користе у култивисаној производњи (јагода), и оне које су доступне и као дивље растуће (малина и купина) у значајној количини. Један од критеријума за одабир наведених биљних врста био је и изостанак литературно доступних података који се односе на њихову употребу у ове сврхе, у тренутку постављања циљева овог рада.

2.3.2.1 Јагода (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Јагода је вишегодишња зељаста биљка, састављена од корена, стабла, листова, цветова и плода (сл. 4), и једна је од најпопуларнијих воћних врста у свету. До 2012. године, површина под засадима јагода износила је преко 2.400 km², а у последњим годинама бележи се значајан пораст производних површина. Међутим, климатске разлике између региона узгоја, као и годишње варијације услова, могу негативно утицати на принос (Malone, 2014). Јагода припада породици Rosaceae, а због свог пријатног укуса, богатства витамина и јаке антиоксидативне активности, често се конзумира у оквиру здраве исхране.



Слика 4. Фотографија гајене јагоде (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Табела 1. Систематика гајене јагоде (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Царство	Plantae
---------	---------



Раздео	<i>Magnoliophyta</i>
Класа	<i>Magnoliopsida</i>
Ред	<i>Rosales</i>
Породица	<i>Rosaceae</i>
Потпородица	<i>Rosoideae</i>
Племе	<i>Potentilleae</i>
Потплеће	<i>Fragariinae</i>
Род	<i>Fragaria</i>

Њена потрошња се доводи у везу са смањеним ризиком од карцинома, упалних стања и кардиоваскуларних болести. Међу биолошки активним једињењима, најзаступљенија су фенолна једињења и антоцијани, познати по свом антиоксидативном деловању. У јагоди се налазе фенолна једињења као што су гална и *p*-кумаринска киселина, као и флавоноиди попут кверцетина и кемпферола. Интензивна црвена боја јагоде потиче од антоцијанских пигмената као што су пеларгонидин-3-глукозид, цијанидин-3-глукозид и пеларгонидин-3-рутинозид (Adak et al., 2017).

Главне групе једињења у листовима јагоде су флавоноли, фенолне киселине, масне киселине и њихови деривати. Постоје разлике у садржају и врсти једињења у листовима и плодовима. Млади листови јагоде садрже знатно више полифенолних једињења у поређењу са плодом и старим листовима, док је елагинска киселина детектована у највећој концентрацији (Michalska et al., 2017). Као једно од доминантних једињења у листовима јагоде издваја се катехин, уз присуство извесних количина сиригинске киселине и пиноцембрина (Kim et al., 2016). У листовима је такође идентификовано присуство бис-хексахидроксидифенол-глукозе (врсте елагитанина), рутина, агримонина (изомера галоил-бис-ННДР глукозног димера), кверцетин-3-глукуронида (доминантни флавоноли), а као главне фенолне киселине издвајају се деривати кафеинске, хлорогене и кумаринске киселине (Kårlund et al., 2017; Akšić et al., 2019).

2.3.2.2 Малина (*Rubus idaeus* L.)

Малина спада у вишегодишње листопадне биљке, жбунастог или полужбунастог раста (сл. 5). Поседује вишегодишњи корен и једногодишње или дуге двогодишње изданке. Припада породици Rosaceae, а сорта црвене малине се комерцијално узгаја због бобица. Први пут је поменуо Pliny на почетку хришћанске ере, као дивљу биљку која



потиче са планине Ида, па отуда и ботанички назив малине (Snir, 1988; Popa et al., 2024).



Слика 5. Фотографија дивље малине (*Rubus idaeus* L.)

Табела 2. Систематика малине

Царство	<i>Plantae</i>
Раздео	<i>Magnoliophyta</i>
Класа	<i>Magnoliopsida</i>
Ред	<i>Rosales</i>
Породица	<i>Rosaceae</i>
Потпородица	<i>Rosoideae</i>
Род	<i>Rubus</i>
Подрод	<i>Rubus idaeus</i>

Најпродуктивнија је у областима са благим зимама и дугим умереним летима. Плодови малине важан су дијететски извор антиоксидативних једињења, посебно полифенолних једињења која су позната по својим здравственим предностима (Noratto et al., 2016). Полифеноли спадају у природна једињења која производе превасходно биљке и поседују хемијске карактеристике које карактеришу сва фенолна једињења. Присуство великог броја фенолних структурних јединица карактерише хемијску структуру полифенола. Имају способност да регулишу оксидативни и инфламаторни стрес. Укључени су у обављање структурних функција, привлачење опрашивача,



учествују у одбрани од ултравиолетног зрачења и заштити биљака од микробне колонизације и биљоједа. Сматра се да су одговорни за сензорне и нутритивне карактеристике биљне хране (мирис, боја, опорост) (Bertelli et al., 2021; Cvitanović et al., 2018). Имају способност регулације и инхибирања низа ћелијских сигналних путева. Тако флавоноиди поседују заштитне ефекте код инфламаторних сигналних путева. Полифенолна једињења инхибирају пролиферацију ћелија, ангиогенезу и имобилизацију леукоцита, имају потенцијал стабилизације гвожђа. У људском организму регулишу ћелијске и молекуларне процесе, контролишу имуни систем, спречавају дегенеративне болести које су повезане са оксидативним стресом (Rana et al., 2022; Fraga et al., 2019).

Када је укус малине у питању, он представља комплексну комбинацију стотина испарљивих једињења, од којих је више од 200 идентификовано. Најважније класе једињења идентификоване у малини укључују C13-норизопреноиде, монотерпене, алифатичне и ароматичне угљоводонике, алдехиде, кетоне, алкохоле и сесквитерене. Међу овим једињењима налазе се и нека која су препозната као типична за зреле плодове малине, као што су α - и β -јонони, α - и β -феландрен, и етил- и ацетатни естри. Остала испарљива једињења, као што су бензалдехид, 1-хексанол, 2-нонанон, транс-2-хексанол и цис-3-хексанол, имају инхибиторне ефекте против гљивица (Aprea et al., 2010).

Неке студије су показале сличност главних биоактивних једињења у листовима и плоду малине. Листови малине су богатији полифенолима од плодова. Могу се сматрати изворима биоактивних једињења. Листови садрже једињења као што су елагинска, кафеинска, хлорогена, гална и ферулинска киселина, катехин, епикатехин итд. (Ponder and Hallmann, 2019; Maslov et al., 2022). Доминанта једињења су рутин и хлорогена киселина (Kotula et al., 2022), а присутни су још и кемпферол, астрагалин (кемпферол-3-*O*-глукозид), тилирозид (кемпферол-3-*O*- β -D-(6''-*p*-кумароил)глукопиранозид), кверцетин, хиперозид (кверцетин-3-*O*-галактозид), нарцисин (изорамнетин-3-*O*-рутинозид), итд. (Pavlović et al., 2016; Costea et al., 2016; Veljković et al., 2019).

2.3.2.3 Купина (*Rubus spp.*)

Купина представља жбун који припада роду *Rubus* из породице Rosaceae. Спада у вишегодишњу биљку, за коју се претпоставља да потиче из Јерменије, брзог је раста и веома је распрострањена (Memete et al., 2023).

Слика 6. Фотографија дивље купине (*Rubus* spp.)

Табела 3. Систематика купине

Царство	<i>Plantae</i>
Раздео	<i>Tracheophytes</i>
Класа	<i>Angiosperms</i>
Ред	<i>Rosales</i>
Породица	<i>Rosaceae</i>
Род	<i>Rubus</i>
Подрод	<i>Rubus</i> spp.

Купина је воће које садржи изузетне количине фенолних једињења, укључујући антоцијане, флавоноле, хлорогену киселину и процијанидине. Ова једињења имају високе биолошке активности и могу бити од користи као дијететски антиоксиданси (Reátegui et al., 2014). Плодови купине су важан извор биоактивних једињења међу којима су флавоноли, катехини и антоцијанини. Ови молекули имају потенцијал да спрече метаболичке синдроме на различитим нивоима, као што су кардиоваскуларне болести и дијабетес типа II. С друге стране, они играју релевантну улогу у борби биљака против биотског и абиотског стреса. Флавоноли, као класа флавоноида, штите биљку од реактивних врста кисеоника (*reactive oxygen species*, ROS) произведених абиотским стресом, попут UV-B зрачења, засићености тла, одговора на смањење азота у



биљкама, итд. Ова једињења штите биљку и од ROS произведених након биотског стреса изазваног од стране патогена, понашајући се као фитоалоксини (Gutiérrez-Mañero et al., 2015). Имају улогу и у регулисању раста као аукин контролери појединих биљних органа и развоја целе биљке (Gutierrez et al., 2017).

Листови купине богати су фенолним једињењима, од којих су неки флавоноли оквирно идентификовани као моноглукозиди два кверцетин-3-*O*-пентозида, три кверцетин-3-*O*-хексозида и кверцетин-3-*O*-глукуронида. Други деривати кверцетина су идентификовани као 3-метоксихексозид, -3-*O*-рутинозид, и -3-(6''-(3-хидрокси-3-метилглутароил)-галактозид и кверцетин-3-*O*-6-ацетилглукозид (Kolarević et al., 2021). Идентификовани деривати кемпферола су 3-*O*-глукозид-рамнозид-7-*O*-рамнозид, -3-*O*-глукуронид, -3-*O*-6-ацетилглукозид. У екстрактима листова купине идентификовани су деривати фенолних киселина у које се убрајају хлорогена, неохлаорогена и *p*-кумарна. Једињења присутна у листу купине укључују и деривате елагитанина и елагинске киселине (пентозид елагинске киселине, рамнозид и метил пентоза елагинске киселине). Од елагитанина пронађени су сангин Н-6, ламбертианин С, елагитанин хексозид (Oszmiański et al., 2015; Ferlemi and Lamari, 2016).

2.4 Биосинтеза наночестица метала

Биосинтеза наночестица, као „зелена“ (еколошка) метода синтезе наночестица, користи биљне екстракте и привлачи све већу пажњу јер представља одрживу алтернативу хемијским и физичким методама у синтези наночестица метала (Huang et al., 2007). Проблеми који се могу појавити током синтезе применом ове методе, а тичу се самих наночестица и њихове стабилизације, могу бити решени под релативно благим условима (Bar et al., 2009). Ова метода синтезе, поред смањеног утицаја на животну средину у односу на физичке и хемијске методе синтезе, има предност и у потенцијалу за производњу великих количина наночестица које нису контаминирани и имају добро дефинисану величину и морфологију (Nadaroğlu et al., 2017). Још од раније је позната способност биљних екстраката у редукцији металних јона (Mittal et al., 2013). Биљни екстракти се у синтези наночестица могу понашати двојако, тј. као редукциони агенси и као стабилизатори. На карактеристике наночестица утиче избор биљног екстракта будући да различити екстракти садрже различите концентрације и комбинације органских редукционих средстава. У погледу биоредукције, која је управо посредована биљним екстрактом, подразумева се мешање воденог екстракта са воденим раствором

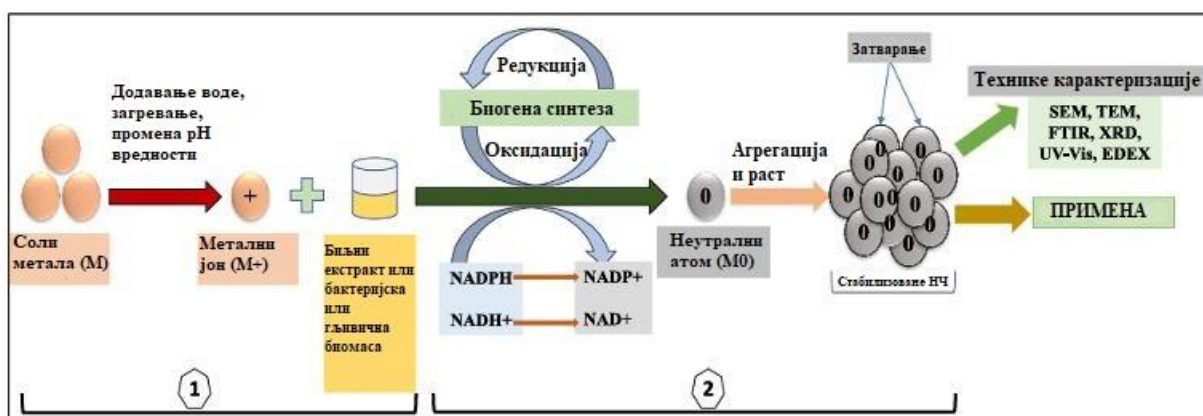


релевантне соли метала (Mittal et al., 2013). С друге стране, биљке акумулирају специфичне метале у облику наночестица на тај начин што редукују њихове јонске облике у различитим органима и ткивима даље од места продирања јона (Nadaroğlu et al., 2017). Ови метали се касније могу екстраховати из биљака што чини основу процеса фитоминирања (рударења биљака).

Формирање наночестица применом биљних екстраката (сл. 7) може се поделити у три фазе (Baranwal, et al., 2016):

- фаза активације – метални јони се редукују у атоме метала, након чега долази до нуклеације;
- фаза раста – мале наночестице спонтано агрегирају и формирају веће наночестице метала. На основу трајања ове фазе зависи каква ће се морфологија наночестица постићи;
- фаза завршетка – биљни екстракт помаже у стабилизацији (затварању) свеже припремљених наночестица, омогућавајући услове за енергетски најповољнију конформацију.

Постоји неколико група биомолекула из биљака који играју кључну улогу у фитонанотехнологији, тј. редукцији метала из њихових соли приликом формирања наночестица. Ови биомолекули обезбеђују стабилизацију наночестица и делују као агенси за затварање. У такве биомолекуле спадају терпеноиди, шећери, флавоноиди, протеини/пептиди, танини и др (Qamar and Ahmad, 2021). Такође, на формирање наночестица утичу неколико фактора, као што су рН, температура, концентрација реактаната, време тока реакције и др. (Baranwal, et al., 2016).



Слика 7. Шема биосинтезе и стабилизације наночестица (Qamar and Ahmad, 2021)



Вредности pH и температура реакционе смеше представљају главне параметре за праћење синтезе наночестица метала уз коришћење биљних екстраката. Могу се генерисати наночестице различите величине, облика и морфологије као резултат различите концентрације водоникових јона и промене температуре. Што је нижа pH вредност, то је већа величина формираних наночестица метала, и обрнуто. У погледу температуре, зелена синтеза подразумева примену температуре испод 100 °C. Виша температура реакционе смеше доводи до формирања високо сферних наночестица, док ниже температуре доводе до формирања нанотроуглова. Дакле, постоји директна и јасна веза између величине формираних наночестица и температуре реакционе смеше (Mamdooh and Naeem, 2022). По неким сазнањима и концентрација екстраката утиче на величину и геометрију формираних наночестица метала (Baranwal et al., 2016).

2.5 Методе анализе и карактеризације екстраката и наночестица метала

2.5.1 Течна хроматографија – масена спектрометрија (LC-MS)

Течна хроматографија ултра-високих перформанси (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) у тандему са масеном спектрометријом представља моћну аналитичку технику која обједињује високу ефикасност раздвајања течном хроматографијом (LC) са осетљивом и селективном анализом масеном спектрометријом (MS).

Течна хроматографија се користи за раздвајање различитих компоненти смеше. Узорак се раствара у растварачу и пропушта кроз колону која садржи стационарну фазу. Различита једињења у узорку интерагују са пуњењем колоне различитим афинитетом у зависности од своје структуре, што за последицу има кретање кроз колону различитим брзинама, тј. раздвајање једињења.

Након раздвајања течном хроматографијом свако од једињења се анализира масеним спектрометром који идентификује једињења мерењем односа масе и наелектрисања њихових јона и насталих фрагмената (Vogeser and Parhofer, 2007).

У раду Sim и сарадника (2013) ова анализа је примењена за испитивање метанолних екстраката добијених из биљака *Sinomenium acutum*, *Stephania tetrandra*, *Cocculus trilobus* и *Aristolochia fangchi*, при чему су као главна једињења наведени синоменин, изосиноменин, фангхинолин и тетрандрин. Водени екстракти узгојених и самониклих



изданака *Hypericum undulatum* показали су присуство бројних фенолних једињења. Међу њима су издвојени 5-О-кафеоилхинска киселина и кверцетин, који је присутан само у самониклом *H. undulatum*, као и његови гликозиди: хиперозид, изокверцитрин и кверцитрин, као и епикатехин. Поред ових, идентификована су и једињења лутеолин-хексозид, кверцетин-3-О-арабиносид и апигенин-гликозид (Rainha et al., 2012), која доприносе богатству фенолног профила водених екстраката.

Фитохемијска анализа применом UPLC-ESI-MS открила је присуство фенола, флавоноида, алкалоида, гликозида, аминокиселина, протеина, сапонина и танина у водено-метанолном екстракту листова *Morinda coreia* (Sandhanasamy et al., 2023). Водени екстракти надземних делова *Hibiscus calyphyllus*, *H. micranthus* и *H. deflersii* богати су различитим биолошки активним једињењима. Идентификоване су главне групе деривата фенолних једињења, укључујући метил-галат, дериват синрингинске киселине, 4-хидроксибензојеву и 3-хидроксибензојеву киселину, фенолне алкоhole као што је тиросол, бројне флавоноиде (ориентин, кемпферол-8-С-глукозид, виценин, лутеолин С-хексозид-С-пентозид, апигенин С-хексозид-С-пентозид, апигенин-6-С-глукозид-8-С-рибозид, диосметин С-глукозид-С-пентозид), флавоноидне агликоне, девет деривата антоцијанина, деривате масних киселина, као и неколико липофилних и азотних једињења (Al-Yousef et al., 2020). У раду Oldoni и сарадника (2019), водено-етанолни екстракт листова *Moringa oleifera* показао је присуство фенолних киселина и њихових деривата (хлорогена киселина, 3-ферулоилхининска киселина, 3-О-р-кумарилхининска киселина, гална киселина), аминокиселина, органских киселина, флавоноида (најзаступљенији кемпферол и кверцетин и њихови деривати) и фитохормона (абсцисинска киселина). Етанолни екстракт листова *Hedera helix* је такође анализиран течноом хроматографијом, при чему су међу идентификованим једињењима откривени α -хедерин – тритерпенски сапонин, и хедерацосид С – тритерпенски сапонин (Kim et al., 2017).

D'Urso и сарадници (2018) су анализирањем водено-етанолног екстракта листова дивље јагоде *Fragaria vesca*, и једне култивисане врсте, идентификовали 27 метаболита који припадају органским киселинама, флавоноидима, катехинима и њиховим олигомерима, и елагитанинима. Истраживање метанолних екстраката листова различитих врста малина (европска црвена малина, аустралијска црвена малина, америчка малина, врсте Јесење блаженство, Heritage, Tulameen, Longyuan Qiufeng и Qiuping Fengman Hong), показало је да европска црвена малина има највећи садржај укупних фенола, као и највиши ниво хлорогенске киселине и рутина (Luo et al., 2020). Oszmiański и сарадници



(2015) су у свом раду анализирали метанолне екстракте листова двадесет шест врста дивљих купина, при чему су потврдили присуство фенолних једињења, углавном елагитанина, који су присутни у дивљим купинама *Rubus grabowski*, *Rubus pedemontanus*, *Rubus winmeranus* и *Rubus pomobustus*.

2.5.2 Електронска (UV-Vis) спектрофотометрија

Техника која се користи за почетну потврду формирања металних наночестица је UV-Vis (ултраљубичаста-видљива) спектрофотометрија. Покрива област UV и видљивог зрачења електромагнетног спектра, при чему се UV зрачење налази у опсегу 190 – 380 nm, а видљиво зрачење 380 – 800 nm. UV-Vis техника најчешће користи светлост опсега таласних дужина 300 – 800 nm за идентификацију, карактеризацију и анализу наночестица метала различитих величина, имајући у виду да наночестице сребра и злата показују апсорпцију у областима таласних дужина од 400 – 450 nm и 500 – 550 nm, респективно (Baranwal et al., 2016).

Као што је већ напоменуто, наночестице метала поседују слободне електроне који приказују апсорпциону траку површинске плазмонске резонанце (SPR траку), услед међусобних вибрација електрона у резонанци са светлосним таласом. Положај и облик SPR траке зависи од величине, облика и расподеле величине честица (Anandalakshmi et al., 2016; Vijayan, 2018). Наночестице метала синтетисане под одређеним условима имају јаку апсорпцију формирајући спектар у видљивој области (Vijayaram et al., 2024), док се интензитет апсорпционе траке повећава са повећањем времена синтезе (Sathishkumar et al., 2009), уз промену боје од безбојне до црвенкасто-жуће за наночестице сребра, или до љубичасте за наночестице злата. Ове карактеристичне варијације боја су управо последица површинске плазмонске резонанце у наночестицама метала (Mallikarjuna et al., 2011; Kouvaris et al., 2012). Повећање интензитета траке указује на повећање концентрације наночестица (Naghizadeh et al., 2021; Bidaki et al., 2022), а појава црвеног померања сугерише на формирање наночестица већих димензија (Bar et al., 2009). Апсорпциони максимуми у спектрима наночестица метала синтетисаних зеленим методама детектовани су у опсегу 420 – 480 nm, док су за хемијски синтетисане наночестице детектовани у опсегу 380 – 450 nm. Ова разлика може бити последица разлике у расподели величина синтетисаних наночестица (Amooaghaie et al., 2015).

Када је у питању брзина редукције јона сребра, у односу на јоне злата, треба имати у виду да је редокс потенцијал сребра значајно нижи, што води до спорије синтезе



наночестица сребра у односу на начестице злата (Joseph and Mathew, 2015). Када су, с друге стране, у питању величина и облик наночестица сребра, мање и сферне наночестице апсорбују на ~ 400 nm показујући уске траке, док веће наночестице показују црвено померање максимума, односно апсорбују на већим таласним дужинама уз појаву широких трака. Уколико наступи агрегација наночестица, долази до смањења интензитета и ширења трака са појавом секундарних пикова при већим таласним дужинама (Dawadi et al., 2021; Yilmaz et al., 2011). Шири SPR трака означава и формирање анизотропних наночестица (Alam et al., 2014).

На појаву SPR траке, на њен интензитет и облик, утичу и услови синтезе као што су температура и рН. Повећање температуре очекивано доводи до скраћења времена трајања синтезе (Ahmad et al., 2020); на повишеној температури формирање наночестица је тренутно, а интензитет траке се константо повећава. Код наночестица злата трака има сложенију конфигурацију, при чему је главни пик на ~ 537 nm, а раме на ~ 688 nm. Повећање температуре доводи до појаве оштријег пика и ширег рамена уз црвено померање спектра. Формирање две апсорпционе траке на краћим и дужим таласним дужинама представља последицу уздужне и попречне осцилације површинског плазмона, а овај феномен је повезан са анизотропијом формираних наночестица метала (Kajani et al., 2016; Alam et al., 2014). При рН 7, брзина формирања наночестица злата је највећа, при чему се јавља савршено симетрична и оштра SPR трака на 551 nm, док се при рН 5 брзина формирања наночестица злата нагло смањује, уз појаву шире SPR траке на 533 nm и слабе траке на 617 nm (Amendola et al., 2017; Alam et al., 2014). Интензитет апсорпционе траке код наночестица сребра се повећава са повећањем рН вредности у опсегу 6 – 10, што указује да су наночестице сребра склоније формирању у базној средини због јонизације фенолних група присутних у екстрактима (Zhou and Tang, 2018). Формиране наночестице сребра дају оштру и јаку апсорпциону траку у споменутој области (Singh et al., 2018); на положај апсорпционе траке утиче и концентрација екстракта (Asif et al., 2022), тако да смањењем концентрације екстракта долази до померања SPR траке из области виших ка областима нижих таласних дужина (Singh et al., 2010). Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова купине *Rubus discolor* (Ghasemi et al., 2024) показале су SPR максимум апсорпције на 456 nm што је, по ауторима, у складу са резултатима других публикација за наночестице сребра синтетисане употребом екстраката других биљака. Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова малине дале су тамно браон реакциону смешу на крају синтезе, која је трајала 3 h на собној температури, са



SPR траком на 416 nm (Pradeepa et al., 2014), док су наночестице сребра, синетисане воденим екстрактом листа јагоде на $T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, дале опалесцентну тамно сиву реакциону смешу са SPR траком на 457 nm (Bayat et al., 2021).

2.5.3 Инфрацрвена спектrophотометрија са Фуријеовом трансформацијом (FT-IR)

Инфрацрвени спектrophотометар са Фуријеов трансформацијом (FT-IR) користи Мајкелсонов интерферометар за снимање спектра. Идентификација молекула помоћу FT-IR спектроскопије често омогућава увид у процесе који се одвијају на површини наноматеријала. Многе функционалне групе попут $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{NH}_2$ итд. имају карактеристичне апсорпционе траке у инфрацрвеном спектру. Дакле, инфрацрвена спектrophотометрија је користан алат за испитивање присуства инфрацрвено активних молекула на површини наноматеријала (Mohamed et al., 2017). FT-IR спектар приказује апсорпцију или трансмисију у функцији таласног броја и пружа детаљне информације о везама и функционалним групама у молекулу које поседују перманентни диполни момент (Vijayaram et al., 2024; Pasieczna-Patkowska et al., 2025).

Употреба FT-IR спектrophотометрије у анализи наночестица формираних применом зелене синтезе условљена је бројним детаљима повезаним са њиховом синтезом, стабилизацијом и применом. Ова спектроскопска метода има могућност да детектује специфичне апсорпционе траке које одговарају различитим функционалним групама биомолекула и да предвиди њихово учешће у редукцији и стабилизацији металних јона или формирању наночестица метала. Присуство одређених пикова у спектру помаже у потврди ефикасне синтезе управо указујући на постојање карактеристичних функционалних група биомолекула које учествују у формирању наночестица (Kumar et al., 2010). Дакле, FT-IR спектар синтетисаних наночестица сугерише које функционалне групе биомолекула делују као редукциони агенси, средства за „затварање“ и стабилизацију током процеса биосинтезе (Huq et al., 2022). Бројни су радови у којима су аутори користили FT-IR спектrophотометрију за доказивање интеракције биомолекула из екстракта са металним језгром наночестица. Devadiga и сарадници (2017) су анализирали синтетисане наночестице сребра применом воденог екстракта листова *Terminalia catappa*; MubarakAli и сарадници (2011) су анализирали синтетисане наночестице сребра и злата применом воденог екстракта листова *Mentha piperita*; екстракти добијени под различитим условима из семена *Pimpinella anisum* примењени



су у синтези наночестица сребра и злата, које су потом анализирани како би се окарактерисале функционалне групе које учествују у стабилизацији наночестица (Zayed et al., 2019); наночестице сребра синтетисане применом воденог екстракта семена *Salvia spinosa* анализирани су након синтезе, опет у циљу идентификације функционалних група присутних на површини наночестица (Pirtarighat et al., 2019), итд. Наведени резултати, поред карактеризације различитих функционалних група на површини синтетисаних наночестица, управо описују улогу биоактивних супстанци у инкапсулацији и стабилизацији наночестица (Devadiga et al., 2017). FT-IR анализа наночестица сребра и злата, синтетисаних уз примену воденог екстракта листова *Clerodendrum inerme*, описала је површинске функционалне групе на основу карактеристичних трака које одговарају вибрацијама C=C ($1520 - 1590 \text{ cm}^{-1}$), C-H ($2750 - 2860 \text{ cm}^{-1}$), O-H ($3310 - 3390 \text{ cm}^{-1}$), N-H ($1415 - 1490 \text{ cm}^{-1}$), C-O-C ($1025 - 1195 \text{ cm}^{-1}$), C-N ($2310 - 2350 \text{ cm}^{-1}$), C=O ($1690 - 1740 \text{ cm}^{-1}$) и O-H ($1250 - 1310 \text{ cm}^{-1}$) веза (Khan et al., 2020). Биоредукција Au^{3+} и Ag^+ у AuNP и AgNP може бити посредована главним функционалним групама као што су C-O, N-H и O-H у различитим хемијским класама једињења као што су флавоноиди, тритерпеноиди, полифеноли, протеини и пигменти у биљном екстракту (Leyu et al., 2023). Слични резултати су добијени анализирањем воденог екстракта листова *Cnidioscolus chayamansa*; благо померање трака које потичу од вибрација -OH групе биомолекула може указати на интеракцију са синтетисаним наночестицама сребра; ове интеракције у великој мери повећавају стабилност колоидних раствора (Dzul-Erosa et al., 2018). Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова купине *Rubus discolor* (Ghasemi et al., 2024), као и наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова малине (Pradeepa et al., 2014) и јагоде (Bayat et al., 2021), су такође окарактерисане на основу горе наведених области вибрација. Аутори су предложили механизам редукције Ag^+ јона од стране C-O⁻ из киселих фенолних група након отпуштања H⁺, сугеришући да електростатичке интеракције фенолних једињења из екстракта пре свега доводе до редукције Ag^+ јона (Ghasemi et al., 2024).

2.5.4 Дифракција X-зрака (XRD)

Рендгенски зраци представљају електромагнетне таласе високе енергије са таласним дужинама у опсегу од 10^{-3} nm до 10 nm . Генерисање рендгенских зрака се обично постиже употребом затворених цеви, ротирајућих анода или синхротронских извора



зрачења. Електрони генерисани загревањем волфрамове нити у вакууму се убрзавају под дејством високонапонског електричног поља, а затим усмеравају ка мети која емитује рендгенске зраке. Упадни електрони индукују два ефекта која доводе до генерисања рендгенских зрака. Први ефекат је успоравање електрона, што доводи до емисије рендгенских фотона са континуираним спектром таласних дужина названим кочионо зрачење. Други је јонизација атома избацивањем електрона из унутрашњих електронских љуски. Како би се постигло стабилније стање, електрон из спољашње љуске прелази у ослобођено место унутрашње љуске. Овај прелаз доводи до емисије фотона са тачно одређеном енергијом која зависи од разлике енергетских нивоа. Емитовано зрачење је познато као карактеристично зрачење, а његова енергија зависи од атомског броја и електронске структуре атома (Ерр, 2016).

Када рендгенски фотони ступе у контакт са материјом може доћи до неколико врста интеракција које доводе до различитих ефеката апсорпције и расејања. Еластично (кохерентно) расејање, такође названо Рејлијево расејање, јавља се између фотона и електрона који окружују атомска језгра. У овом случају енергија расејаног таласа је непромењена, а талас задржава свој фазни однос са упадним зрачењем. Као последица тога рендгенски фотони се расејавају у свим правцима при интеракцији са атомима у озраченој запремини (Noyan and Cohen, 1987). Међутим, услед периодичне структуре кристала, таласи ће бити расејани конструктивно или деструктивно, што доводи до карактеристичних дифракционих феномена који се користе у анализи кристалне структуре материјала. Дакле, основни принцип ове методе се заснива на дифракцији рендгенских зрака на периодично распоређеним атомским равнима и детекцији дифракционог сигнала у зависности од угла или енергије (Bragg, 1913). Дифракција Х-зрака прашкастих узорака се широко користи у индустрији где је потребно познавање структуре чврстих материја (Clearfield, 2009). Овај систем је такође користан за дефинисање квалитативног и квантитативног састава материјала. Коначно, XRD анализа се примењује и за препознавање и потврђивање величине и структуре кристалних наночестица метала (Vijayaragam et al., 2024). Наночестице метала се обично анализирају у облику праха након сушења, а састав честица се може одредити упоређивањем положаја и интензитета пикова са доступним референтним обрасцима (Kumar et al., 2022). Анализа наночестица сребра и злата синтетисаних зеленом методом, уз примену воденог екстракта листова *Aerva lanata* (Joseph and Mathew, 2015) као стабилизационог агенса, показала је спектар AgNPs са четири 2θ дифракциона пика на вредностима $38,26^\circ$, $46,12^\circ$, $64,72^\circ$ и $77,08^\circ$ који одговарају рефлексијама (111), (200),



(220) и (311) површински центриране кубне решетке наночестица сребра. Спектар AuNPs такође је показао четири пика са 2θ вредностима $38,28^\circ$, $44,63^\circ$, $64,79^\circ$ и $77,54^\circ$ који одговарају рефлексним равнима (111), (200), (220) и (311) површински центриране кубне решетке наночестица злата. Код обе врсте наночестица, најинтензивнији пик био је онај који одговара равни (111), што сугерише да су нанокристали претежно оријентисани дуж ове равни (Joseph and Mathew, 2015; Alam et al., 2014; Boomi et al., 2019). Ширина XRD пика који одговара (111) равни даје величину наночестица метала (Baranwal et al., 2016). Остали пикови настају као резултат присуства органских делова на површини наночестица. Ови дифракциони пикови могу бити последица присуства „затварајућих“ агенаса попут биомолекула који учествују у стабилизацији наночестица метала (Akter et al., 2020; Ahmed et al., 2019). Повећање концентрације екстракта доводи до проширења дифракционих пикова што условљава смањење величине кристалита (Ajitha et al., 2015). Описана XRD метода може указати на важне карактеристике наночестица које зависе од њихове величине, а рефлектују се као неправилан положај, висина и ширина пикова у добијеном спектру (Annamalai et al., 2013). Наночестице сребра, стабилизоване етанолним екстрактом плода *Santalum album*, показале су такође кристалну структуру површински центриране кубне решетке (Mehta et al., 2017). У раду аутора Naraginti и Li (2017), просечна величина формираних наночестица сребра и злата износила је око 35 nm и 20 nm, респективно, док су нанокристали првенствено били оријентисани дуж (111) равни. Биметалне наночестице сребро-злато нису показале битне разлике од самих наночестица сребра и злата (Gopinath et al., 2016), што се може објаснити њиховом сличном кристалном решетком. Коришћена је Scherrerova једначина за процену просечне величине кристалита, израчунате као 26,53 nm за сребро, 21,87 nm за злато и 14,25 nm за биметалне наночестице сребро-злато. Истоветну структуру површински центриране кубне решетке показале су и наночестице сребра и злата стабилизоване воденим екстрактом листова *Butea monosperma* (Patra et al., 2015). Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова купине *Rubus discolor* (Ghasemi et al., 2024), као и наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова малине (Pradeera et al., 2014), су дале површински центрирану кубну ћелију са равнима (111), (200), (220) и (311) и просечном величином честица од 18 nm и 10 – 15 nm, респективно, на основу XRD анализе. Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листа јагоде су дале идентичну кристалну структуру са просечном величином честица од 40,9 nm (Bayat et al., 2021).



2.5.5. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)

Реч микроскоп потиче од грчких речи *mikros* (мали) и *skopeo* (погледати). Као и код сваког микроскопа, примарна функција скенирајућег електронског микроскопа јесте увећање малих карактеристика или објеката. Микроскоп функционише коришћењем електронског снопа уместо светлости која се користи за формирање слика у оптичким светлосним микроскопима. Дакле, електрична струја пролази кроз електромагнетне калемове и сочива како би довело до генерисања фокусираног снопа електрона високе енергије, који се сударају са површином узорка и на тај начин доводе до стварања секундарних електрона (Alharbi et al., 2022). Захваљујући малој таласној дужини, електрони су у стању да разликују финије карактеристике/детаље материјала у много већој мери у поређењу са оптичком светлошћу. Савремени електронски микроскоп може да увећа објекте до милион пута њихове оригиналне величине и може да раздвоји детаље на субмикронском и нано нивоу, мање од 1 nm (Ul-Hamid, 2018). Скенирајућа електронска микроскопија је алат који се користи за карактеризацију материјала и пружа информације о површинској структури, саставу и дефектима у чврстим и растреситим материјалима. Ова метода при нижој резолуцији има одређене предности као што су већа дубина анализе услед ниже просторне резолуције рендгенског зрачења, као и могућност примене корекционих поступака код дебљих узорака (Hajizadeh et al., 2022).

У анализи синтетисаних наночестица метала, SEM микроскопија се примењује за идентификацију облика, величине, морфологије и дистрибуције формираних наночестица (Vijayaram et al., 2024; Khan et al., 2018). Различите методе синтезе, које се примењују у производњи наночестица, утичу на њихову величину, облик и површинске особине (Harish et al., 2022). SEM анализа коришћена је у раду Revathi и сарадника (2024) код синтетисаних наночестица сребра уз примену воденог екстракта *Acacia nilotica* као стабилизационог агенса. Овом анализом је потврђено присуство изузетно малих наночестица неправилног облика, генерисаних на 80 °C (Revathi et al., 2024; Sadeghi and Gholamhoseinpoor, 2015). Истовремено, детектоване су и веће наночестице сребра које се формирају као резултат агрегације, што може представљати последицу испаравања растварача током припреме узорка. Наведени фактори могу утицати на појаву различитих величина наночестица (Revathi et al., 2024; Rasheed et al., 2018). SEM анализа такође показује равномерно распоређене наночестице злата синтетисане воденим екстрактом листова *Stevia rebaudiana*, што потврђује стабилизацију



наночестица применом овог екстракта као средства за стабилизацију (Sadeghi et al., 2015). Екстракти листова различитих биљака који се примењују као редукциони и стабилизациони агенси у синтези наночестица формирају наночестице различитих облика, као што су сферни, троугласти, коцкасти и др. Разлог ове разноликости може бити доступност различите количине и природе стабилизационих агенаса присутних у различитим екстрактима листова биљака (Banerjee et al., 2014). Морфологија наночестица може бити доведена у везу са температуром и брзином реакције. На вишим температурама већина јона злата прво формира језгра, а секундарни раст наночестица се зауставља јер је брзина реакције веома висока (Singh et al., 2013). SEM анализа наночестица сребра синтетисаних употребом воденог екстракта листова *Ziziphora tenuior* указује на равномерно распоређене наночестице које су сферног облика (Sadeghi et al., 2015). Сличну морфологију, сферни облик и равномерну распоређеност, показале су и наночестице злата синтетисане применом метанолног екстракта листова *Stevia rebaudiana*, са распоном величина честица од 21 до 45 nm (Sadeghi et al., 2015). Употреба воденог екстракта зелене микроалге *Chlorella vulgaris* у синтези наночестица сребра такође је дала високо кристалне, агрегисане, сферне наночестице различитих величина (Annamalai and Nallamuthu, 2016); синтеза наночестица сребра применом водених екстраката добијених из различитих биљних врста (лук, парадајз, *Acacia catechu* и комбинација ових биљака) потврдила је кристалне и сферне облике за све добијене наночестице (Chand et al., 2020). Sinha и сарадници (2015) окарактерисали су наночестице сребра кубног и хексагоналног облика, са величинама у опсегу од 25 до 44 nm, синтетисане применом воденог екстракта зелене алге *Pithophora oedogonia*, док су Singh и сарадници (2010) синтетисали наночестице сребра величине од 10 до 50 nm, са кубним и хексагоналном обликом, коришћењем екстракта листова *Argemone mexicana*. Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова малине (Pradeepa et al., 2014) су показале сферне и кубне облике са димензијама испод 100 nm на основу SEM анализе са увећањем од 20,000 пута, док су наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листа јагоде показале сферни облик са просечном величином од 50 nm (Bayat et al., 2021).

2.5.6 Енерго-дисперзивна спектрометрија (EDX)

Енерго-дисперзивна спектрометрија представља напредну микроаналитичку технику која се често користи у комбинацији са скенирајућом електронском микроскопијом



(SEM). Она пружа полу-квантитативне и полу-квалитативне информације о елементима присутним на површини узорка, тако да се применом EDX анализе може одредити елементни састав и хемијска конфигурација површине (Quadri et al., 2023). Ова се техника заснива на озрачивању узорка снопом електрона. Електрони из електронског снопа, приликом судара са површином узорка, избацују електроне из унутрашњих електронских љуски, а прелаз електрона из спољашњих љуски на упражњена места у унутрашњим љускама доводи до емисије рендгенског зрачења. Због јединствене атомске структуре, сваки елемент емитује карактеристично рендгенско зрачење, што омогућава примену ове методе у одређивању елементног састава узорка (Joudeh and Linke, 2022).

Подаци добијени EDX анализом приказују се у виду спектра зависности интензитета од енергије. Рендгенско зрачење које емитује сваки елемент има карактеристичну енергију и таласну дужину, што се у EDX спектру манифестује појавом пикова на специфичним енергетским позицијама (Hossain et al., 2022). Ова анализа је примењива на елементе са атомским бројем већим од 10 (Hajizadeh et al., 2022).

Увођењем органских молекула из екстраката у систем, приликом зелене синтезе наночестица, уочени су пикови елемената као што су N, C, O, S и P, што потврђује адхезију органских једињења на површини метала. Резултати EDX анализе могу се приказати и у облику атомских или масених удела (процената) појединих елемената. Основна предност EDX методе лежи у њеној способности да омогући брзу идентификацију хемијског састава површине и да пружи квантитативне доказе о присуству органских једињења на металу. Са друге стране, значајно ограничење EDX анализе јесте то што не пружа директне доказе о интеракцији између метала и биомолекула (стабилизатора). Детекција рендгенског зрачења није осетљива на хемијско стање елемената, али јесте на утицај међуелементних интерференција, познатих у рендгенској спектрометрији као преклапање пикова (*peak overlap*), што може изазвати озбиљне проблеме у елементној анализи. Управо је то разлог поуздане детекције углавном елемената са атомским бројем већим од 10. Минимална концентрација детекције, која захтева одређено усредњавање сигнала, износи приближно 0,1 mmol по килограму сувог узорка (око 10 ppm), док се просторна резолуција креће од приближно 10 nm до неколико микрометара (Scimesa et al., 2014). Смањење границе детекције захтева већи број детектованих импулса, што се може постићи повећањем времена бројања и/или повећањем струје електронског снопа. Наведене вредности границе детекције односе се на биолошке узорке код којих је



средњи атомски број (који одређује интензитет континуалног зрачења) релативно низак (нпр. С, Н, N, Cl, P, K). Биолошки узорци који садрже тешке елементе показују више границе детекције услед већег позадинског сигнала (Scimeca et al., 2018; Morgan, 1985). EDX техника се управо најчешће користи за потврду присуства одређених елемената у биогеним наночестицама. Наночестице добијене употребом биљног екстракта су обавијене танким слојем неке органске компоненте која потиче из екстракта и има улогу стабилизатора, што доводи до настанка морфолошки различитих наночестица (Ipek et al., 2023). На пример, EDX је коришћена за потврду присуства злата у AuNPs синтетисаним екстрактом листа *Jasminum auriculatum* (Balasubramanian et al., 2020), паладијума у PdNPs добијеним екстрактом *Pulicaria glutinosa* (Khan et al., 2014), телура у TeNPs синтетисаним помоћу екстракта из *Penicillium chrysogenum* PTCC 5031 (Barabadi et al., 2018), као и сребра у AgNPs добијеним применом екстракта из *Trichoderma viride* (Fayaz et al., 2010). EDX анализа се изузетно често примењује код испитивања синтетисаних наночестица сребра и злата. Јаки сигнали у спектрима јављају се на карактеристичним енергијама од 2 – 4 keV за сребро и 2 – 2,5 keV, 8 – 8,5 keV и 9,5 – 10 keV за злато (Vijayan et al., 2018). Енергетски сигнали елемената као што су угљеник, кисеоник и азот указују на присуство органских функционалних група које потичу од полифенола, флавоноида или протеина присутних у екстрактима, као и од порозног угљеничног филма који служи као носач узорака наночестица (Fafal et al., 2017; Hamelian et al., 2018; Khan et al., 2020). Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова купине *Rubus discolor* (Ghasemi et al., 2024), као и наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова малине (Pradeepa et al., 2014) и јагоде (Bayat et al., 2021), су дале јасне сигнале које потичу од нанокристала сребра на око 3 keV.

2.5.7 Динамичко расејање светлости (DLS) и zeta-потенцијал

Спектроскопија динамичког расејања светлости (*Dynamic Light Scattering*, DLS), позната и као спектроскопија фотонске корелације (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), квазиеластична спектроскопија расејања светлости (*Quasielastic Light Scattering Spectroscopy*, QLS) или спектроскопија ласерског расејања светлости (*Laser Light Scattering Spectroscopy*, LLS), омогућава мерење термалног (Брауновог) кретања честица анализирајући временске флукуације у интензитету расејане светлости (Weiss, 2022).



Као што је напоменуто, динамичко расејање светлости се заснива на мерењу флукуација интензитета расејане светлости услед Брауновог кретања честица у раствору. Честице у раствору се непрестано насумично крећу што доводи до локалних промена концентрације честица и интерференције расејаних таласа. Ове флукуације интензитета анализирају се помоћу аутокорелационе функције интензитет-интензитет, која омогућава одређивање дифузионог коефицијента честица (Karmakar, 2019; Kumar and Dixit, 2017). Дифузија честица повезана је са транслационим трењем, као и са радијусом честица и вискозношћу раствора, према Ајнштајн-Стоксовој релацији. На основу израчунатог дифузионог коефицијента могу се проценити величина честица, молекулска маса, интеракциона дужина и други физичко-хемијски параметри система (Rahdar et al., 2019).

DLS је често коришћена техника за физичко-хемијску карактеризацију наночестица метала, посебно за процену величине и расподеле величина честица. Она је репродуктивна, захтева кратко време мерења, прецизна је у одређивању хидродинамичке величине монодисперзних узорака и може се применити на разређеним узорцима различитих концентрација, омогућавајући и детекцију малих количина честица већих молекулских маса (Shnoudeh et al., 2019). Ова техника се широко користи за одређивање величине наночестица различитих метала као што су Fe, Au и Ag (Goon et al., 2009; Phenrat et al., 2009; Anandalakshmi, Venugobal and Ramasamy, 2016). Међутим, мерење величине наночестица метала DLS методом има одређене изазове који подразумевају превлачење наночестица макромолекулима ради побољшања колоидне стабилности у инжењерским апликацијама и постојање дипол-дипол магнетних интеракција између не-суперпарамагнетских наночестица. Макромолекули који се адсорбују на површини наночестица метала имају тенденцију да повећају стварну хидродинамичку величину честица у пречнику; ово повећање пречника управо омогућава мерење дебљине адсорбованог слоја макромолекула (Shnoudeh et al., 2019). Разлике у величини честица које настају услед наведених феномена представљају ограничавајући фактор у постизању добре корелације и, самим тим, прецизног одређивања величине наночестица. Разлог је у томе што не постоји апсолутна контрола над процесом синтезе, а хемијска реакција која лежи у основи синтезе наночестица доводи до формирања наночестица различитих облика и величина. Међутим, фином оптимизацијом и подешавањем услова синтезе могу се добити наночестице са високим степеном униформности. Припрема узорака је такође јако



важна приликом извођења DLS мерења, будући да мало загађење прашином или влакнима може довести до непоузданих резултата (Kumar and Dixit, 2017).

Потребно је познавати природу наелектрисања честица и моделе расподеле наелектрисања у честицама и околној течности да би се објаснио zeta-потенцијал наночестица метала. Око сваке честице (непревучене наночестице металног оксида) формира се течни двослој који се састоји од унутрашњег региона, у коме су јони чврсто везани за површину честице (Стернов слој), и спољашњег региона у коме су јони слабије везани и распоређени тако да површинско наелектрисање честице одступа од електронеутралности (дифузни слој). Унутар дифузног слоја постоји хипотетичка граница (*slipping plane*) у којој јони и честице формирају стабилан/крут ентитет. Дакле, када се честица креће под дејством електричног поља, јони унутар ове границе се крећу са честицом, а јони ван границе мигрирају одвојено у дисперзионој течности (Lowry et al., 2016). Zeta-потенцијал представља вредност електростатичког потенцијала на имагинарној равни клизања (названој површином хидродинамичког смицања), тј. на површини где честице интерагују једна са другом или са другим површинама. Величина zeta-потенцијала служи као показатељ стабилности дисперзије против агрегације или седиментације. Наночестице са zeta-потенцијалом изнад ± 30 mV се обично сматрају умерено стабилним услед електростатичке стабилизације, то јест, електростатичке одбојне силе су довољно јаке да спрече агрегацију. Када све честице у суспензији имају велики негативан или позитиван zeta-потенцијал оне се међусобно одбијају и немају тенденцију ка агломерацији. Добра стабилност наночестица је дефинисана у области 40 – 60 mV, док се наночестице са zeta-потенцијалом изнад 60 mV сматрају изузетно стабилним (Lowry et al., 2016). Утврђено је да је zeta-потенцијал хемијски и биосинтетисаних Ag/Au наночестица углавном негативан што указује на њихово међусобно одбијање и повећану стабилност (Roy et al., 2013; Thongwattana et al., 2024). Просечна величина наночестица сребра синтетисаних помоћу воденог екстракта листа *Perilla frutescens* износила је 28,3 – 161 nm, док је zeta-потенцијал био $-18,1 \pm 0,72$ mV (Tavan et al., 2023). Синтеза наночестица сребра и злата уз примену галне киселине (ГК) као стабилизатора показала је да се код обе врсте наночестица величина линеарно повећава са повећањем концентрације галне киселине. У случају AgNPs, повећање величине било је од 35 nm до 79 nm са порастом садржаја ГК од 0,156 mM до 5 mM (Khan et al., 2020). Код AuNPs, повећање величине кретало се од 18 nm до 59 nm у испитиваном опсегу концентрација ГК од 0 до 2,5 mM. Вредност zeta-потенцијала AgNPs смањивала се од -33 mV до -40 mV са повећањем концентрације ГК, док је код



AuNPs вредност zeta-потенцијала најпре опадала са -36 mV на -42 mV , а затим поново расла до -36 mV . Ови резултати указују да се високо негативно наелектрисање и даље одржава на површини наночестица услед присуства негативно наелектрисаних карбоксилних група везаних за површину наночестица, што обезбеђује стабилност насталу услед електростатичког одбијања наночестица у раствору (Khan et al., 2020). Међутим, код наночестица злата синтетисаних воденим екстрактима цитруса (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) вредности zeta-потенцијала показале су ниже вредности током синтезе у којој је примењена нижа концентрација екстракта, док су више вредности zeta-потенцијала добијене код синтетисаних наночестица када је примењена виша концентрација екстракта. Богат извор лимунске и аскорбинске киселине у екстракту цитрусног воћа може бити одговоран за редукцију јона метала и ефикасну стабилизацију синтетисаних наночестица. Функционалне групе из лимунске и аскорбинске киселине имају повећану способност везивања за јоне метала, формирајући филм преко наночестица који спречава њихову агрегацију (Sujitha and Kannan, 2013; Rónavári et al., 2021). У раду Tyagi и сарадника (2021) дате су вредности zeta-потенцијала код биосинтетисаних наночестица сребра и злата употребом воденог екстракта из листова *Hibiscus Rosa sinensis*, као и хемијски синтетисаних наночестица применом тринатријум цитрат дихидрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), које су износиле $-23,19\text{ mV}$ и $-23,90\text{ mV}$, $-29,18\text{ mV}$ и $-18,30\text{ mV}$, респективно. Наночестице сребра синтетисане воденим екстрактом листова купине *Rubus discolor* су показале вредности zeta-потенцијала и величине честица од $-44,2\text{ mV}$ и $151,7\text{ nm}$, респективно. Величина честица одређена овом методом била је знатно већа у поређењу са XRD и TEM методама (18 nm и 37 nm , респективно), што је објашњено разликом у механизмима снимања наведених метода и постојању хидродинамичког пречника који DLS метода региструје (Ghasemi et al., 2024).

2.6 Биолошка активност екстракта и наночестица метала

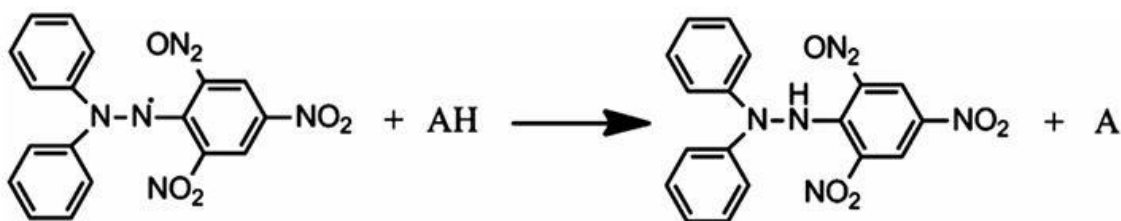
2.6.1 Антиоксидативна активност – DPPH тест

Оксидативни стрес (ОС) је дефинисан као неравнотежа између прооксиданаса и антиоксиданаса, карактерише се немогућношћу ендогених антиоксиданаса да се супротставе оксидативном оштећењу ткива и организама услед прекомерне производње ћелијских ROS/RNS (*Reactive Oxygen Species/Reactive Nitrogen Species*). Наведене кисеоничне и азотне честице су високо реактивне и могу изазвати оксидативну



модификацију биолошких макромолекула као што су липиди, протеини и ДНК, што доводи до оштећења ткива, убрзане ћелијске смрти и разних болести, као што су атеросклероза, дијабетес, хронична упала, неуродегенеративни поремећаји, кардиоваскуларне болести, Алцхајмерова болест, благо когнитивно оштећење, Паркинсонова болест и одређене врсте рака (Prenzler et al., 2021). Бројни докази указују на то да антиоксиданси играју кључну улогу у одржавању људског здравља и превенцији и лечењу ових болести због своје способности да смање оксидативни стрес (Sun et al., 2017). Дакле, антиоксиданс може деловати директно уклањањем реактивних врста или инхибирањем њиховог стварања, или може деловати индиректно појачавањем ендogene антиоксидативне одбране (Nenadis and Tsimidou, 2017). За одређивање антиоксидативне активности примењују се методе, засноване на спектрофотометријском мерењу, које подразумевају механизме преноса атома водоника или преноса електрона са антиоксиданса на слободни радикал, са неутрализацијом слободног радикала као крајњим исходом.

DPPH тест је једноставна и једна од најчешће коришћених метода одређивања антиоксидативне активности. Заснива се на редукцији љубичастог DPPH радикала антиоксидансом (АН) путем преноса атома водоника што доводи до преласка у стабилан, светложут DPPHН молекул (Mishra et al., 2012) према реакцији:



Преостала количина DPPH радикала мери се посредно UV-Vis спектрофотометром на таласној дужини 515 – 520 nm, што чини основу теста у одређивању антиоксидативне активности. Ова метода је једноставна јер захтева само један реагенс (DPPH) и антиоксиданс, а спроводи се под благим експерименталним условима. Као растварач за DPPH радикал најчешће се користи метанол или етанол, јер омогућавају растворљивост и поларних и неполарних антиоксиданаса. Резултати се најчешће изражавају као проценат инхибиције DPPH радикала (% I), или ефикасна концентрација (EC₅₀) која

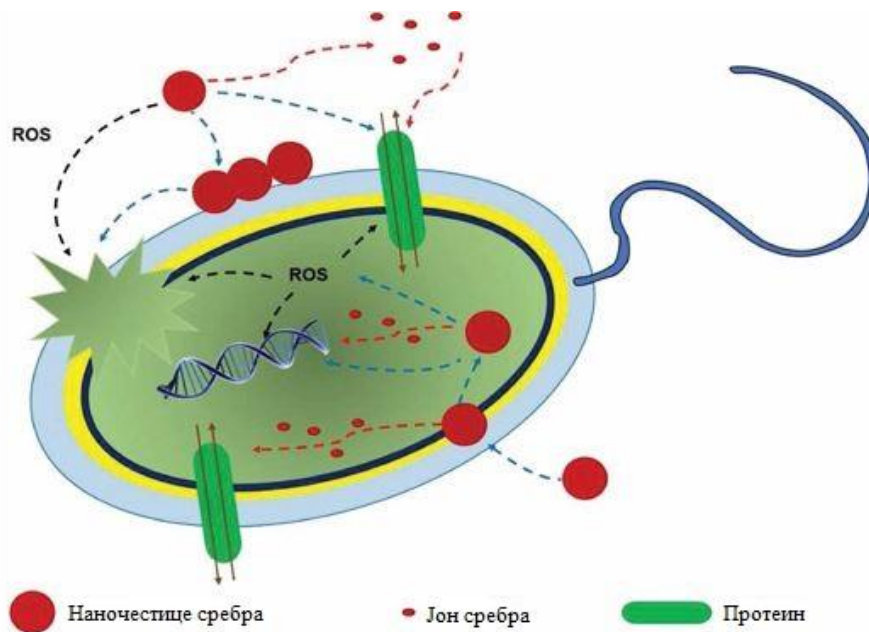


представља концентрацију екстракта која редукује 50% DPPH радикала (Sirivibulkovit et al., 2018).

DPPH тест се често користи за проверу антиоксидативне активности наночестица метала, посебно оних које су синтетисане употребом биљних екстраката. Овим тестом су Alavia и Karimi (2018) тестирали способност неутралисања слободних радикала синтетисаних наночестица сребра, бакра и титанијум-диоксида применом воденог екстракта листова *Artemisia haussknechtii*. Највећу способност неутралисања DPPH слободних радикала показале су наночестице сребра. Показано је и да се инхибиторна активност наночестица сребра повећава са порастом концентрације, при чему је максимална активност од $55,84 \pm 1,31\%$ неутрализације DPPH радикала забележена при највишој испитиваној концентрацији (100 mg cm^{-3}) (Netala et al., 2016). Употребом алкохолног екстракта *Blumea eriantha*. у синтези наночестица сребра и гвожђа продуковане су наночестице сребра које су се показале као ефикасније у неутралисању слободних радикала у односу на наночестице гвожђа и сам екстракт. При концентрацији од $50 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$, степен неутралисања слободних радикала од стране наночестице сребра износио је $20,66 \pm 0,90\%$, док је при истој концентрацији за наночестице гвожђа забележена вредност од $17,25 \pm 1,19\%$ (Chavan et al., 2020).

2.6.2 Антибактеријска активност наночестица метала

Убрзано повећање резистенције бактерија на постојеће антибиотике условљава потребу за развијањем нових антибиотика против бактеријских патогена који угрожавају живот људи и животиња. Сходно томе, наночестице, а поготову наночестице сребра, поседују велики потенцијал као одржива алтернатива у лечењу различитих инфекција. Њихово антибактеријско дејство је повезано са везивањем наночестица на површини бактерија што доводи до стварања високог оксидативног стреса и деструкције микроорганизама (Tang and Zheng, 2018). Механизми деловања подразумевају везивање наночестица за ћелијски зид и мембрану, оштећење интрацелуларних биомолекула услед деловања јона сребра и појаве леталног оксидативног стреса унутар ћелије. Овај механизам је приказан на слици 8 (Ouay and Stellacci, 2015; Dinah, 2019).



Слика 8. Потенцијални антибактеријски механизам наночестица сребра; наносребро може: да се веже за ћелијску мембрану, мембранске протеине и базе ДНК, што доводи до поремећаја нормалне функције (плава испрекидана линија), да ослобађа јоне сребра, утичући на мембрану, ДНК и протеине (црвена испрекидана линија) и да генерише реактивне оксидативне врсте (ROS), које такође могу утицати на ДНК, ћелијску мембрану и мембранске протеине (црна испрекидана линија)

Бактерије поседују баријеру састављену од ћелијског зида и мембране која их штити од спољашњих штетних утицаја, а истовремено омогућава транспорт хранљивих материја у/из ћелије. Према структури ћелијског зида, Gram-позитивне бактерије имају дебео слој пептидогликана, док Gram-негативне бактерије имају танак слој пептидогликана и спољашњу мембрану богату липополисахаридима (LPS) (Salem and Fouda, 2020). У погледу антибактеријске активности, наночестице метала показују већу активност према Gram-негативним бактеријама него према Gram-позитивним. Овај ефекат се може приписати негативном наелектрисању LPS који утиче на лакшу адхезију позитивно наелектрисаних наночестица на површини ћелијског зида. Услед ових интеракција долази до промене пропустљивости ћелијске мембране и нарушавања интегритета бактеријске ћелије. Као последица тога, долази до изласка протеина, ензима, нуклеинских киселина и јона из ћелије, што доводи до нарушавања ћелијске хомеостазе, метаболичке активности и леталног ефекта на самом крају. Дакле, оштећење ћелијског зида и мембране представља први корак у механизму антимикробне активности (Salem and Fouda, 2020). Када се Ag јони нађу унутар ћелије, долази до њиховог интеркалирања између азотних базних парова без формирања водоничних веза, што на крају доводи до оштећења ДНК. Концентрација AgNPs утиче



на антибактеријски ефекат будући да повећана концентрација наночестица доводи до брже пропустљивости мембране, што даље води до бржег пуцања ћелијског зида бактерија (Baranwal, et al. 2016).

Постоји обрнуто пропорционална повезаност између негативног површинског наелектрисања наночестица сребра и њиховог токсичног деловања на ћелије бактерија. Наиме, што је већа негативна вредност zeta-потенцијала наночестица, повећава се електростатичка баријера која се формира у контакту са ћелијама бактерија. Повећана баријера ограничава интеракције и на тај начин смањује токсичност наночестица (Tang and Zheng, 2018).

На антибактеријску активност утиче и величина наночестица; потврђено је да наночестице мање величине (15 nm) показују већу антибактеријску активност. То подразумева да само наночестице малих димензија могу да се вежу за мембрану, уђу у цитоплазму бактерија и изазову њихову смрт (Slavin et al., 2017).

На ефикасну активност наночестица утиче и њихов облик. Најбољу активност показују наночестице троугластог облика, затим сферне наночестице и наноштапићи (Tang and Zheng, 2018). Ово се може објаснити чињеницом да наночестице троугластог облика поседују највећи проценат изложених фасета, што утиче на директну интеракцију наноплоча са површином бактерија и доводи до побољшаног везивања за површину, апсорпције од стране ћелија и ефикасније деструкције бактерија (Tang and Zheng, 2018). Наночестице сребра и злата показују изражену антибактеријску активност према патогеним Gram-негативним бактеријама, као што су *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* и *Citrobacter sp.* (Salem and Fouda, 2020). Такође, биосинтетисане AgNP и AuNP показују активност и против патогених Gram-позитивних бактерија, као што су *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (укључујући MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* и *Bacillus subtilis* (Salem and Fouda, 2020). Биосинтетисане AgNP испољавају фунгицидну активност према једноћелијским и вишећелијским гљивицама, као што су *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida krusei*, *Fusarium solani*, *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus gattii*, *Candida tropicalis*, *Sporothrix schenckii*, *Epidermophyton floccosum*, *Candida albicans* и *Mucor hiemalis* (Salem and Fouda, 2020). Поред тога, наночестице интерагују са тиолним групама аминокиселине цистеина, што резултира



инактивацијом ензима и даљим нарушавањем ћелијских функција микроорганизама (Salem and Fouda, 2020).

2.6.3 *In vitro* цитотоксична активност наночестица метала

Нивои вијабилности и брзина пролиферације представљају показатеље доброг здравља ћелија. Међутим, физички и хемијски агенси могу утицати на здравље и метаболизам ћелија. За ћелијске културе *in vitro*, једињење или третман сматра се цитотоксичним ако омета ћелијско везивање, у значајној мери мења морфологију, негативно утиче на брзину раста ћелија или доводи до њене смрти (Ishiyama et al., 1996). Тестови виталности и цитотоксичности *in vitro*, са култивисаним ћелијама, широко се користе за проверу цитотоксичности хемикалија. Постоје различите класификације за ове тестове према врстама мерења крајњих стања (промена боје, флуоресценција, луминисценција и др.) (Kamiloglu et al., 2020):

1. искључивање боје – тестови са трипан плавим, еозином, конго црвеним, еритрозином В;
2. колориметријски тестови – МТТ тест, МТS тест, НТТ тест, WST-1 тест, WST-8 тест, LDH тест, SRB тест, NRU тест и кристал љубичасто тест;
3. флуорометријски тестови – тест са аламар плавим и CFDA-AM тест;
4. луминометријски тестови – АТФ тест и тест виталности у реалном времену.

MTT тест

МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2-5-дифенилтетразолијум бромид) представља један од најчешће коришћених колориметријских тестова за процену цитотоксичности или ћелијске виталности. Овим тестом се одређује ћелијска виталност кроз одређивање митохондријалне функције ћелија мерењем активности митохондријалних ензима, као што је сукцинат хидрогеназа. МТТ се редукује у љубичасти формазаан помоћу NADH (Aslantürk, 2018; Kumar et al., 2018) према реакцији:





Извођење МТТ теста подразумева поступак засејавања ћелија у плоче са 96 бунара које се потом инкубирају 24 h, а након инкубације се третирају различитим концентрацијама узорка током 24 – 48 h на 37 °C. Третиране ћелије се даље инкубирају са МТТ, а након инкубације МТТ се раствара у неком од растварача (SDS-HCl или DMSO) како би се растворили кристали формазана. Тест се ради спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 570 nm, док се вијабилност ћелије изражава као проценат инхибиције у односу на контролу (Choudhury et al., 2010; Rejiya et al., 2009). Вредности апсорбанце су пропорционалне броју виталних ћелија, што пружа индиректну меру ћелијске пролиферације и метаболичке активности. Овај тест је посебно користан у скринингу лекова, студијама цитотоксичности и у одређивању ефеката експерименталних третмана на здравље ћелија (Arunachalam and Sreeja, 2025).

Описани тест се примењује за испитивање цитотоксичности наночестица метала, посебно наночестица сребра и злата. Неколико истраживача доказало је да наночестице могу изазвати токсичност канцерогених ћелија и стога се могу користити као потенцијални терапеутски агенси против рака (Singh et al., 2018). С друге стране, истраживање цитотоксичности синтетисаних наночестица сребра и злата стабилизваних воденим екстрактима листа и коре *Syzygium jambos* показало је да су наночестице нетоксичне за ћелијске линије HeLa (*human cervical cancer cell line*) и L6 (*rat skeletal muscle cell line*) (Dutta et al., 2017). Наночестице злата, синтетисане екстрактом цвета *Couroupita guianensis*, показале су значајну цитотоксичност у HL-60 (Human Leukemia-60) ћелијама доводећи до промена у морфологији умирујућих HL-60 ћелија (Geetha et al., 2013). Цитотоксичност наночестица зависи од функционалних група, површинског наелектрисања и величине саме честице. Поред тога, тип ћелије представља одлучујући фактор у осетљивости на потенцијалне цитотоксичне ефекте наночестица. „Зелено“ синтетисане наночестице сребра и злата, применом етарског уља *Mentha spicata*, показале су *in vitro* цитотоксична својства према HEPG-2 ћелијама (hepatocellular carcinoma) (Moosavy et al., 2023). Цитотоксична активност наночестица сребра и злата тестирана је и на ћелијским линијама RAW 246.7 (макрофаги мишева, неканцерогене), A549 (ћелије рака плућа код људи) и HeLa (ћелије рака грлића материце код жена). Наночестице нису показале цитотоксичност према RAW 246.7 ћелијама, док је код наночестица сребра раст A549 ћелијске линије био је инхибиран до $11 \pm 0,5\%$; раст HeLa ћелијске линије је такође био инхибиран у присуству тестираних наночестица метала. Са друге стране, наночестице злата нису показале цитотоксичан ефекат према A549 ћелијама, где је вијабилност износила $87,9 \pm 2,3\%$ при истој



концентрацији. Међутим, наночестице злата су показале благу цитотоксичност према HeLa ћелијама, смањујући вијабилност на $67,8 \pm 1,1\%$ при концентрацији $10 \mu\text{gcm}^{-3}$ (Singh et al., 2018).

2.6.4 *In vitro* анти-инфламаторна активност наночестица метала

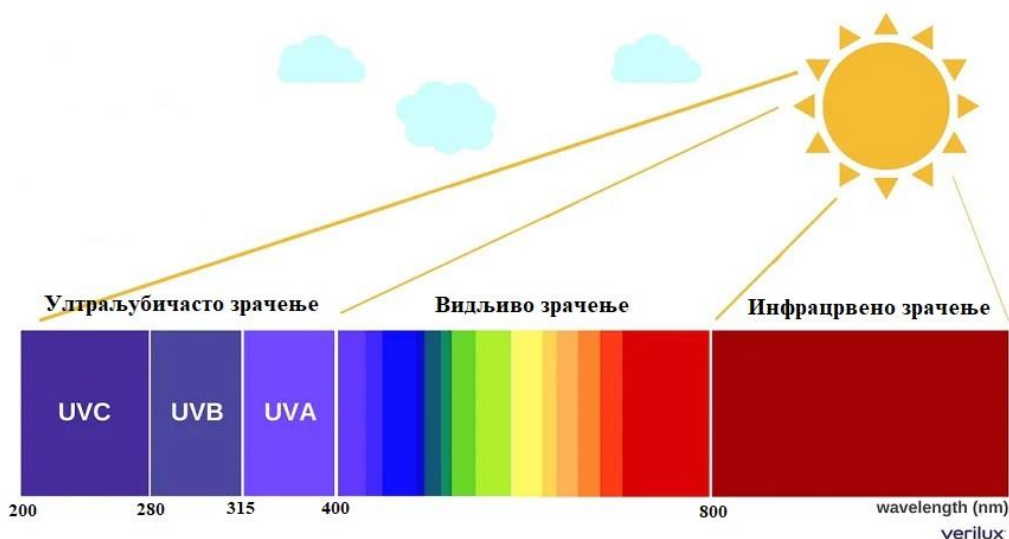
Инфламација (упала, запаљење) се дефинише као каскада физиолошких одговора на бројне спољашње утицаје, као што су повреде, штетни патогени и оштећене ћелије. Постоји неколико потенцијалних инфламаторних молекула као што су ензими, моноамини, цитокини и хемокини које луче имуне ћелије, тј. леукоцити, макрофаги, мастоцити, Т-ћелије и НК ћелије (Jacob et al., 2012). Добро је позната чињеница да реактивне врсте кисеоника играју кључну улогу у модификацији инфламаторног одговора током акутне упале, што на крају узрокује оштећење ћелија и оштећење ткива. Годинама се стероидни и нестероидни антиинфламаторни лекови користе као главни терапијски агенси за лечење упале, али повезани нежељени ефекти ограничавају њихову употребу. Стога је потребан развој алтернативних лекова без нежељених ефеката са сличним потенцијалом (Zuhrotun et al., 2023).

У последњим деценијама, наночестице метала су препознате као обећавајући антиинфламаторни агенси. Наночестице имају неколико предности у погледу антиинфламаторне активности: велики однос површине и запремине, што им омогућава ефикасније блокирање инфламаторних медијатора као што су цитокини и ензими који учествују у инфламацији, бољу способност продирања у инфламаторне и епителне ћелије чиме се повећава њихова ефикасност, као и бољу селективност ка циљним местима (Agarwal et al., 2019; Viscido et al., 2014). У овом контексту, истраживачи су синтетисали AgNP користећи екстракте *Sambucus nigra* и *Piper nigrum* и закључили да синтетисане NP имају потенцијал као антиинфламаторни агенси, како у *in vitro*, тако и *in vivo* условима (Baranwal et al., 2016; Manikandan et al., 2017). Синтеза наночестица злата уз употребу хлорогене киселине показала је бољу антиинфламаторну активност у поређењу са самом хлорогеном киселином, уз мањи токсични ефекат. Ове „зелено“ синтетисане наночестице су показале способност инхибиције инфламаторних цитокина, као и гена повезаних са инфламацијом, путем инхибиције транслокације NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Patil et al., 2023; Hwang et al., 2015).



2.6.5 Фактор заштите од сунца (SPF)

Електромагнетна зрачења представљају таласе, са одређеном таласном дужином, енергијом и фреквенцијом, који су разврстани у светлосне спектре опадајућег реда таласних дужина које чине радио таласи, микроталаси, терахерцна зрачења, инфрацрвено зрачење (IC), видљива светлост, UV-зрачење, X-зрачење и γ -зрачење (Shade et al., 2005). Земља добија енергију од Сунца управо у виду електромагнетног зрачења. Електромагнетно зрачење које долази до Земљине атмосфере састоји се од видљиве, инфрацрвене, ултраљубичасте светлости, X-зрака итд. Највећи део од укупне енергије коју носи електромагнетно зрачење, а која допире до површине Земље, одлази на инфрацрвену и видљиву светлост (око 90%). Оне су одговорне за загревање Земљине површине и живот на њој (Afaq, 2011). Остале делове спектра апсорбује атмосфера, тако да ултравиолетна светлост учествује са свега 8% у укупној енергији која долази до површине Земље (сл. 9).



Слика 9. Део електромагнетног зрачења које са Сунца доспева до Земљине атмосфере

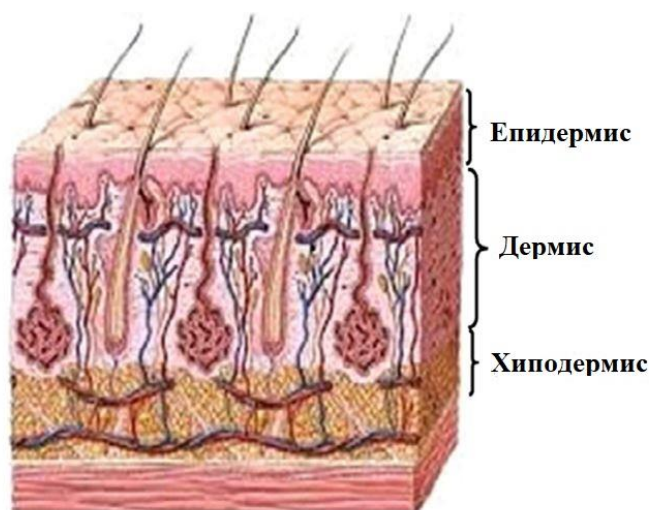
Ултравиолетно зрачење је подељено на различите области у погледу разлика у таласним дужинама: UV-A (320 – 400 nm), UV-B (280 – 320 nm) и UV-C (200 – 280 nm) (González et al., 2008). У атмосфери постоје једињења попут кисеоника, озона и водених пара који могу представљати филтере за UV-C и UV-B зрачење. Они утичу на то да 95% UV-A зрачења доспева до Земље, док UV-C готово никако не може да допре до Земљине површине). UV зрачење јонизацијом молекула и иницирањем хемијских реакција делује као јак мутаген из животне средине, што узрокује оштећење ћелијских



компоненти, и на крају доводи до појава многих болести (Bachelor and Bowden, 2004). Недвосмислено је показано да слободни радикали *in vivo*, који најчешће настају дејством UV светлости, воде до одређених типова болести у биљном и животињском свету (Young, 2006). Код људи, UV зрачење и слободни радикали изазивају разне типове патолошких стања почевши од директног утицаја на DNK и гене (Ichihashi et al., 2003; Pfeifer et al., 2005), као и на протеине и липиде (Davies and Truscott, 2001; Gebecki et al., 2000) у ћелијама и биолошким мембранама. UV-B светлост директно оштећује DNK будући да он апсорбује у тој области, тако да ова област има јак мутагени потенцијал, али и способност генерисања ROS. DNK не апсорбује UV-A светлост, али је она јак оксидант и сматра се најодговорнијом за оксидативне стресове организма (Biesalski and Jevic, 2001). Фотоиндуковани стресови воде до многих болести, као што су старење коже (Ames and Shigenaga, 1992; Wlaschek et al., 2001), оштећење васкуларног ендотела (Wall, 2000), обољења рожњаче и очију (Ciuffi et al., 2003), општи пад имунитета (Halliday et al., 1998, Norval, 2001), и низ других обољења са канцером на самом крају (De Gruijl et al., 2001; Afaq and Mukhtar, 2001).

UV-A зрачење има велику моћ пенетрације у кожу (пенетрација је директно пропорционална таласној дужини), тј. продире у дубље слојеве коже, док се UV-B зрачење апсорбује само површински (Mohania et al., 2017). Имајући ово у виду, велика пажња се оправдано поклања кожи у проналаску решења за њену заштиту од штетних сунчевих зрака. Кожа је највећи орган људског тела и има улогу одбрамбеног система у заштити унутрашњих органа од напада микроорганизама, контаминације, инфекција и других утицаја из спољашње средине. Покрива површину од око 2 m², а њена тежина је већа од 10% од укупне тежине одраслог тела. Улога коже је од виталног значаја јер учествује и у регулисању температуре тела и преношењу информација из спољашње средине (McKnight et al., 2021; Byrd et al., 2018; Cracowski and Roustit, 2020).

Кожа је изграђена из од три хистолошка слоја, епидермиса, дермиса и хиподермиса тј. поткожног слоја (сл. 10). Горњи слојеви епидермиса представљају главну баријеру за перкутано продирање било ког спољашњег утицаја. Слој дермиса се налази одмах испод слоја епидермиса, састоји се од слоја везивног ткива које пружа еластичност и отпорност на деформацију коже. У овом слоју су смештени и крвни судови који снабдевају слојеве хранљивим материјама и кисеоником. Трећи слој, хиподермални слој, представља поткожно масно ткиво који се налази одмах испод епидермиса и дермиса, а његова улога је термичка изолација и механичка заштита тела (Kamoun et al., 2017).



Слика 10. Шематски приказ нормалне структуре коже

У циљу заштите коже од штетног дејства UV зрачења неопходно је систематски развијати препарате са тзв. заштитним факторима, односно препарате који имају за циљ умањење штетног дејства UV зрачења. Фактор заштите од сунчевог зрачења (*Sun Protection Factor*, SPF) може се дефинисати, како је предложила FDA (*Food and Drug Administration*) 1978. године, као нумерички однос између минималне еритемалне дозе (MED) коже заштићене кремом за сунчање, примењене у количини од 2 mg cm^{-2} , и минималне еритемалне дозе незаштићене коже (Schalka and Reis, 2011):

$$\text{SPF} = \text{MED (заштићена кожа)} / \text{MED (незаштићена кожа)}$$

Како би се одредила вредност SPF-а, потребно је извршити одабир групе од 10 до 20 добровољаца, са фототиповима коже I-III (Fitzpatrick-ова класификација), а потом их подвргнути растућим дозама ултраљубичастог зрачења. Ово зрачење се врши путем вештачког извора светлости, тзв. соларног симулатора, у подручјима незаштићене коже, као и коже заштићене кремом за сунчање. Након 16 до 24 h излагања, читава се MED у оба подручја и потом се израчунава њихов однос. Након израчунатог односа, одређују се просечне вредности за групу добровољаца, а те вредности заправо представљају SPF производа (Gaspar et al., 2003). Што је SPF виши, производ је ефикаснији у спречавању опекотина од сунчевог зрачења.

Фотозаштита коју пружају креме за сунчање може се одредити *in vivo* или *in vitro*, а идеално се одређује фототестирањем на добровољцима како је горе описано. Ова врста



одређивања се користи већ дуги низ година. Описана метода је корисна и прецизна, међутим, процес мерења је дуготрајан, сложен и скуп, посебно када су потребне информације које се тичу заштите од дугих таласних дужина (UVA) (Azevedo et al., 1999; Gasparro et al., 1998). Као последица тога, много труда је посвећено развоју *in vitro* техника за процену фотозащитне активности крема за сунчање. *In vitro* методе укључују мерење апсорпције или проласка UV зрачења кроз филмове производа за заштиту од сунчевог зрачења између кварцних плоча или у биомембранама, као и методе у којима се карактеристике апсорпције средстава за заштиту од сунчевог зрачења одређују на основу спектрофотометријских анализа разблажених раствора (Pissavini et al., 2003; Walters et al., 1997). Mansur и сарадници (Mansur et al. 1986) су развили веома једноставну математичку једначину која замењује *in vitro* метод предложен од стране Sayre и сарадника (Sayre et al., 1979), користећи UV спектрофотометријска мерења (Dutra et al., 2004). У овом раду, SPF је управо одређиван стандардизованим *in vitro* методама спектрофотометријски.

2.7 Хидрогелови

Хидрогелови су тродимензионалне хидрофилне полимерне мреже способне да задрже значајну количину воде у својој структури при чему задржавају структурни интегритет (Pathania et al., 2017). Карактерише их биокомпатибилност, подложни су биоразградњи (природни и поједини синтетички, као PLA и PGA) и поседују повољна својства као што је еластичност слична природном ткиву, одржавање влажне средине, апсорпција ексудата из ране и порозна структура која олакшава размену гасова. Осим тога, делују као баријера против бактеријских инфекција и стварају погодно окружење за побољшање ћелијских функција попут миграције и пролиферације. Хидрогелови доприносе и хидратацији ране подстичући влажну средину која олакшава уклањање некротичног ткива путем аутолизе (Arabpour et al., 2024; Deb et al., 2019; Parhi, 2017).

2.7.1 Типови хидрогелова

Подела хидрогелова може се извршити на основу њиховог порекла на природне, синтетичке и полусинтетичке хидрогелове. У природне хидрогелове убрајају се хидрогелови на бази целулозе, колагена, хитозана, хијалуронске киселине, алгината, желатина и фибрина. Природни хидрогелови поседују инхерентну биокомпатибилност, биоактивност, биоразградивост, али поседују релативно слабу стабилност и механичку



чврстоћу (Ahmad et al., 2022; Singh et al., 2017). Синтетички хидрогелови су направљени од синтетичких полимера. Синтетички полимери настају полимеризацијом вештачки синтетисаних мономера, као што су поливинил алкохол (PVA), полиетилен гликол (PEG), полиетилен оксид (PEO), поли-2-хидроксиетилметакрилат (PHEMA), поли-N-изопропилакриламид (PNIPAM), полиакрилна киселина (PAA) и полиакриламид (РААМ) (Ullah et al., 2015; Hennink and Nostrum, 2012). Синтетички хидрогелови поседују високу чврстоћу и стабилност (Zhang and Huang, 2021; Benwood et al., 2021). Полусинтетички хидрогелови обухватају системе добијене хемијском модификацијом природних полимера или њиховом комбинацијом са синтетичким полимерима. Такав пример полимера јесу метакрилоил-модификовани желатин и акрилат-модификована хијалуронска киселина. Ови полимери показују вишеструко подесива својства у зависности од различитих хемијских параметара, уз истовремено задржавање биолошких карактеристике природних хидрогелова (Ho et al., 2022).

2.7.2 Механизми настанка хидрогелова

Хидрогелови који се користе у лечењу рана, као и хидрогелови уопште, настају физичким или хемијским методама умрежавања. Избор методе умрежавања значајно утиче на брзину желирања хидрогела. Хидрогелови захваљујући подесивим физичко-хемијским и биолошким својствима могу се прилагодити различитим захтевима за различите врсте рана на кожи (Arabpour et al., 2024; Brumberg et al., 2021; Boateng et al., 2008).

Физички умрежени хидрогелови настају појавом физичких интеракција, као што су водоничне и нековалентне (поларне или делимично поларне) интеракције. Физички умрежени хидрогелови често испољавају осетљивост на услове средине и способност самопоправљања, која произилази из реверзибилне природе нековалентних интеракција, омогућавајући реорганизацију полимерне мреже након механичког оштећења. Међутим, њихова механичка својства су релативно слаба и имају лошу стабилност што ограничава њихову клиничку применљивост. Да би се побољшала њихова механичка својства, често се користи комбинација различитих метода умрежавања (Arabpour et al., 2024; Ćorković et al., 2021).

Јонски умрежени хидрогелови настају интеракцијом између полиелектролита и супротно наелектрисаних једињења. Механичке карактеристике ових хидрогелова су релативно слабе, а њихова стабилност у физиолошким условима је ограничена. Поред



тога, ослобађање јона током разградње јонских умрежених хидрогелова може изазвати биотоксичност (Arabpour et al., 2024; Ali and Ahmed, 2018; Gulrez et al., 2011).

Хемијско умрежавање је поступак у којем се формирају хемијске везе како би се повезали полимерни ланци, формирајући сложену мрежну структуру под утицајем различитих фактора као што су светлост, топлота, зрачење, ултразвучни таласи и средства за умрежавање. Оно обухвата различите реакције као што су Мајклова (Michael) адиција, формирање Шифове (Schiff) базе, полимеризација слободних радикала, клик хемија и ензимски посредовано умрежавање (Arabpour et al., 2024; Wang et al., 2020; Tang et al., 2023).

Карбопол, односно карбомер, је синтетички полимер. Умрежени карбомерни полимери формирају микрогел-структуру која се широко користи у дерматолошким препаратима. Пошто су ови полимери анјонске природе, потребна им је неутрализација за изградњу микрогела, због чега се користе органски амини попут триетаноламина. Карбопол се користи као средство за суспендовање, стабилизатор и згушњивач, док се триетаноламин (ТЕА) примењује за неутрализацију и формирање гел структуре. (Parashar and Garg, 2023; Zakzak et al., 2024; Rezaei et al., 2024).

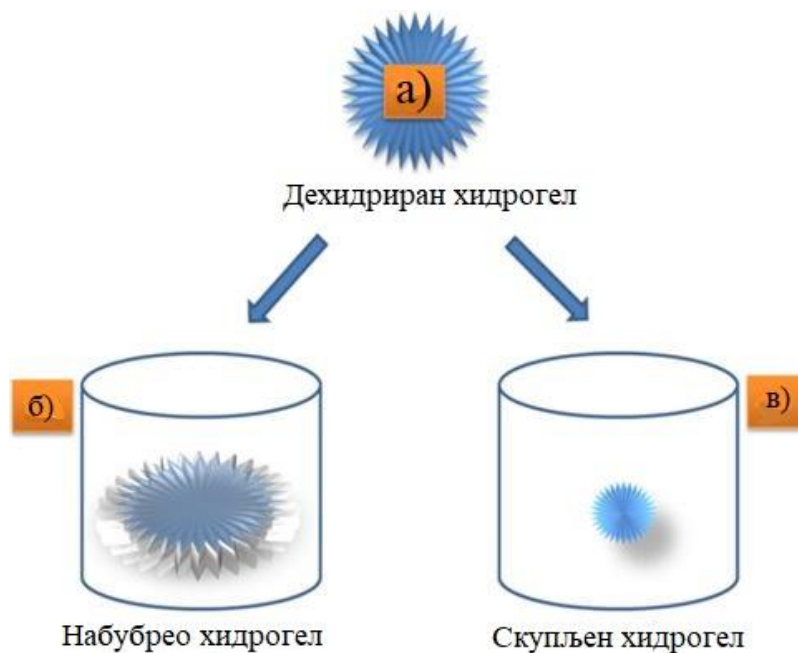
2.7.3 Особине хидрогелова

Неке од важних особина хидрогелова су:

- *бубрење хидрогелова* - хидрогелови су материјали који могу задржати велику количину воде унутар своје структуре без распадања. Бубрење је карактеристично својство хидрогелова које зависи од различитих карактеристика околине као што су јачина умрежавања, јонска средина, рН, температура и хемијска структура полимера. Мала промена услова околине може изазвати брзе и реверзибилне промене у хидрогелу (Boral et al., 2006; Shih and Lin, 2012). Степен бубрења, који представља однос тежине набубрелог гела и сувог гела, користи се за квантификацију карактеристика бубрења хидрогелова. Степен бубрења хидрогела зависи од степена умрежавања: хидрогелови - јаче умрежени, показују нижи степен бубрења, док слабије умрежени системи имају већи степен бубрења. Због присуства хидрофобних и хидрофилних група, хемијска структура утиче на бубрење хидрогелова. Хидрогелови који садрже више хидрофилних група више бубре у поређењу са хидрогеловима који имају хидрофобне групе (Zhang et al., 2005; Ahmad et al., 2022). Код хидрогелова осетљивих на рН долази до ширења услед јонизације



хидрофилних група које се мењају са променом pH средине (Akhtar et al., 2016; Bardajee et al., 2017). Приликом бубрења, у полимерним ланцима хидрогела долази до електростатичког одбијања што резултира слабљењем и разбијањем секундарних интеракција у полимерној мрежи (Lee, 1985; Ehrenhofer et al., 2020). Прва фаза у бубрењу хидрогелова је дифузија воде у мрежу хидрогела, праћена одмотавањем полимерних ланаца, док је развој односно ширење мреже хидрогела трећа фаза бубрења хидрогелова (Buenger et al., 2012; Wang et al., 2020). У сувом стању, хидрогел је компактан и гладак, док је у проширеном стању гумасте структуре. Интеракција ширења је одговорна за пролаз и излаз воде из матрице хидрогела. На слици 11 је приказан изглед хидрогела у зависности од садржаја воде (Zhang et al., 2023; Ahmad et al., 2022).



Слика 11. Дехидрирани (а), набубрели (б) и контраховани (в) хидрогел као резултат малих промена спољашњих стимулуса (pH, температура и концентрација анализата) који утичу на хидрофилност хидрогела

- *Механичка својства хидрогелова* – укључују њихово понашање под стресом. Механичка својства хидрогелова укључују затезну чврстоћу, проценат издужења до кидања, жилавост и Јангов модул (Young's modulus) еластичности (Oyen, 2014). Варирањем степена умрежавања могу се добити жељене механичке карактеристике хидрогела. Чвршћи и механички отпорнији хидрогел може се створити повећањем степена умрежавања. Што је већи степен умрежавања, то је нижи проценат издужења хидрогелова, што резултира крхкијом структуром



хидрогела. Као резултат тога постоји оптималан степен умрежавања за генерисање умерено робусног, али еластичног хидрогела (Zhang et al., 2023). Механичке карактеристике хидрогелова су посебно од интереса у фармаколошким и биолошким применама. Процена механичких својстава је од кључног значаја у разним биомедицинским применама, као што су матрица за испоруку лекова, зарастање лигамената, тетива и развој замена за хрскавично ткиво (Chirani et al., 2015; Benamer et al., 2006). Механичка својства требају бити таква да хидрогелови могу задржати своју физичку текстуру, као материјал за превијање рана и ткивно инжењерство, док испоручују терапеутске принципе током одређеног периода. Хидрогелови су управо привлачни за биомедицинске примене због велике разноликости механичких својстава; они имају јединствено својство познато као пороеластичност. Пороеластичност подразумева механичко својство материјала којим се описује понашање тог материјала формираног од чврсте порозне матрице испуњене флуидом (углавном водом). То је временски зависна деформација која је независна од протока флуида (Oyen, 2014; Ahmad et al., 2022).

- Поред овога, хидрогелови имају два главна механичка својства: вискоеластичност (тренутна еластична деформација и временски зависно вискозно понашање (пузање и релаксацију напона)) и гумену еластичност (односно способност повратка у првобитни облик након деформације). Еластичност хидрогелова потиче од полимерне матрице, док покретљивост воде у мрежној структури дефинише њихов вискозитет. Примењена механичка сила у великој мери утиче на вискоеластична својства. Може се рећи да вискоеластична својства хидрогелова зависе од примењеног напона. Напон је пропорционалан деформацији у еластичном материјалу, и пропорционалан брзини деформације за вискозне материјале (Gulrez et al., 2011; Ahmad et al., 2022).
- *Биокомпатибилна својства* - Биокомпатибилност подразумева способност материјала да функционише у контакту са биолошким системом без изазивања нежељених или штетних реакција организма домаћина. Биокомпатибилност се дефинише кроз две компоненте, биофункционалности и биолошке безбедности. Биолошка безбедност је прави одговор домаћина који није само системски, већ и локални (El-Sherbiny and Yacoub, 2013) док је биофункционалност способност материјала да обави прецизан задатак за који је дизајниран (Lin et al., 2021). Да



би се проценила биокомпатибилност хидрогелова, користе се три главна теста на ћелијским културама: елуција (разблаживање екстракта), директан контакт и дифузија у агар. Хидрогелови намењени биомедицинској примени треба да буду биокомпатибилни и нетоксични (Morais et al., 2010; Irmukhametova et al., 2020). Многи синтетички полимери су нетоксични и биокомпатибилни са живим ћелијама. На HeLa ћелијама је тестирана цитотоксичност хидрогелова на бази поли(акрилне киселине), полиглутаминске киселине, поли(метакрилне киселине), и ови хидрогелови су показали 90% преживљавања ћелија. Већина полисахарида је биокомпатибилна и корисна као биоматеријали. Иако су синтетички хидрогелови донекле нетоксични, они имају нижу цитокомпатибилност од природних полисахарида (Ahmad et al., 2022).

- *Биоразградивост* – разградња хидрогелова у безопасне нуспроизводе од стране живих организама. Употреба хидрогелова који имају биоразградивост је критична у биомедицинској области. Биоразградивост хидрогелова одређују хемијске групе присутне у системима, као и начин припреме хидрогелова (Thang et al., 2023). Хидрофилни полимери, природни и синтетички, су примери биоразградивих полимера. Апсорпција воде изазива значајно бубрење хидрогелова који се на крају растварају. На разградњу ових полимера утиче неколико параметара, укључујући хидрофилност и интеракцију полимера и воде. Други елементи, као што су температура и рН, могу утицати на разградњу хидрогела променом њихове растворљивости (Teixeira et al., 2012; Barclay et al., 2019). Хемијска хидролиза може уништити неке полимере који се не могу биоразградити једноставном хидролизом. Поред тога, хидрогелови се могу разградити ензимском хидролизом, што се односи на неке полимере као што су полисахариди, протеини и синтетички полипептиди. Ови полимери се могу користити у системима за испоруку лекова управо због могућности ензимске разградње (Lin et al., 2021; Ahmad et al., 2022).

2.7.4 Примена хидрогелова у медицини

Хидрогелови имају широк спектар примене због свог различитог дизајна и способности да реагују у различитим срединама (Ahmad et al., 2022). Користе се у превејању рана, испоруци лекова, трансдермалним системима, стоматолошким материјалима, имплантима, инјекционим полимерним системима, офталмолошким применама,



органима хибридног типа, као абсорбенти у пеленама за једнократну употребу, у прехранбеној индустрији и пољопривреди, као филтери за пречишћавање воде и др. (Chirani et al., 2015).

Афинитет хидрогелова према воденој средини, у којој долази до бубрења, и степен умрежавања у матрици, могу резултирати хидрогелним структурама високе порозности. Због своје порозне архитектуре, хидрогелови су изузетно пропустљиви за многе врсте лекова што омогућава њихову испоруку на одређено место под контролисаним условима. Способност хидрогелова да продужено ослобађају лекове резултира високим концентрацијама активног медицинског материјала на одређеним локацијама током дужих периода (Ahmed, 2015; Majcher and Hoare, 2019). Поред тога, хидрогелови се користе за израду контактних сочива, завоја за ране и електрода или сензора (Bahram et al., 2016).

Хидрогелови функционишу као природни екстрацелуларни матрикс, подстичући пролиферацију ћелија и поновни раст ткива. Псеудо-екстрацелуларни матрикс, који је направљен од фактора раста, метаболита и других компоненти, повезује ћелије и управља структуром ткива, са крајњим циљем замене недостајућег или повређеног природног ткива (Tsang and Bhatia, 2004; Khan et al., 2021; Rehman et al., 2021). Хидрогелови могу допринети допремању воде на место ране, помажући у одржавању влажне средине, што резултира бржим зарастањем рана. Процес зарастања рана може се убрзати применом различитих агенаса који стимулишу специфичне биолошке одговоре. Хидрогелови представљају један од таквих приступа (Rehman et al., 2020). С друге стране, хидрогелови показују значајну заштиту од напада микроорганизама. Ова два главна фактора чине хидрогелове ефикасним у унапређењу алтернативних терапија за зарастање и превијање рана (Aldakheel et al., 2023). Aquaform, Intracore, GranuGel, Nu-Gel, Purilon и Storage су примери таквих хидрогелова. Они, као што је напоменуто, абсорбују одређену количину ексудата из ране и транспортују влагу и кисеоник, док је њихова бактеријска и флуидна пропустљивост одређена секундарним превлаком која се наноси (Ahmad et al., 2022). Најзад, хидрогелови припремљени коришћењем наночестица метала представљају најчешће примењиван метод добијања антибактеријских формулација (Ahmad et al., 2022).

2.7.4.1 Хидрогелови са наночестицама метала

Хидрогелови умрежени јонима метала представљају перспективну класу материјала због могућности унапређења антимикробне активности, убрзаног формирања



хидрогелне мреже, као и испољавања својстава самоисцељивања и изражених вискоеластичних карактеристика. Упркос наведеним предностима, за њихову примену у биомедицини и даље постоји потреба за систематичнијим и детаљнијим испитивањем биокомпатибилности (Wahid et al., 2017). У том смислу, наночестице сребра и злата се интензивно истражују као функционални адитиви у полимерним хидрогелским системима порозне структуре. До сада су успешно инкорпорисане у различите природне и синтетичке полимерне матрице као што су алгинат (Zhang et al., 2014), хитозан (Chen et al., 2021; Lu et al., 2018), желатин (Yang et al., 2017), коњак глукоманан (Jiang et al., 2020), хидроксипропил-метилцелулоза (Soliman et al., 2022), карбоксиметил-целулоза (Alshehri et al., 2016), карбоксиметил-хитозан (Shariatinia, 2018), поливинил-алкохол (Pandian et al., 2021), карбопол (Badhwar et al., 2021), желатин-метакрилат (Qu et al., 2020), полиакриламид (Ferrag et al., 2021), полиетиленимин (Yang et al., 2022) и поливинилпиролidon (Deng et al., 2021; Ruiz et al., 2023). Бројне студије указују на изражену антимикуробну ефикасност оваквих хидрогелних система. Тако су хидрогелови формулисани на бази наночестица сребра синтетисаних употребом воденог екстракта плода *Manilkara zapota*, уз примену два различита карбопола, показали широк спектар антимикуробне активности против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Aspergillus niger* (Parashar and Garg, 2023). Поред тога, биополимер карбоксиметил-целулоза (СМС), модификован наночестицама цинк-оксида и злата, синтетисаним и стабилизованим филтратом слободних ћелија подлоге *Penicillium crustosum*, је испољио значајна антимикуробна и антиоксидативна својства (Abboud et al., 2024).

Посебан апликативни значај ових материјала огледа се у регенерацији ткива и зарастању рана. *In vitro* и *in vivo* студије показале су да хидрогел формулисан од наночестица сребра синтетисаних воденим екстрактом плода *Citrus aurantium* и пектина, као природног полисахарида, значајно убрзава процес зарастања рана. Овај ефекат се приписује израженом антибактеријском и антиинфламаторном дејству, способности регулације поларизације макрофага са М1 на М2 фенотип, као и подстицању ангиогенезе и депозиције колагена (Chang et al., 2025). Слично томе, наночестице сребра синтетисане уз помоћ екстракта чауре биљке *Papaver somniferum*, и инкорпорисане у хидрогел на бази поливинил-алкохола (PVA), показале су изражену антимикуробну активност против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и карбапенем-резистентних сојева *Acinetobacter baumannii* (CRAB), уз дуготрајну инхибицију раста микроорганизама до 24 часа. Додатно, *in vivo* испитивања



зарастања рана потврдила су добру биокомпатибилност ових хидрогелних композита током 14-дневног периода третмана (Shehzad et al., 2025).

У складу са Регулативом (ЕС) бр. 1223/2009, наноматеријали у козметичким производима подлежу строгој безбедносној процени. Нанооблици цинк-оксида и титан-диоксида представљају најбоље дефинисане и регулаторно одобрене системе, док употреба наночестица сребра и злата није универзално одобрена и захтева индивидуалну процену безбедности.



3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 Материјал и прибор

Реагенси коришћени у овој дисертацији били су комерцијални производи: сребро нитрат (AgNO_3 , RTB Бор, Србија), хлороауринска киселина (Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate, $\text{HAuCl}_4 \times n\text{H}_2\text{O}$, Fisher Chemical, Loughborough, United Kingdom), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) радикал (Sigma – Aldrich Corporation), диметил сулфид (DMSO), калијум бромид (KBr, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), полиакрилна киселина (Carbomer 940) (ISP, Germany), триетаноламин (TEA) (BASF, Germany), глицерол и пропилен гликол (Sigma Aldrich). За калибрацију ICP-OES спектрометра коришћени су стандардни раствор арсена (As) за ICP анализу, концентрације 1 gdm^{-3} , припремљен у разблаженој HNO_3 (traceable to NIST, Loba Chemie), сертификовани вишекомпонентни референтни стандардни раствор који садржи 32 компоненте, концентрације 100 mgdm^{-3} (Ag, Al, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Ge, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Nb, Ni, P, Pb, Re, Sb, Si, Sn, Ta, Ti, V, W и Zn) у 5% HNO_3 (CPA Chem, Bogomilovo, Bulgaria), као и вишекомпонентни стандардни раствор ICP multi-element standard solution IV, који садржи 23 елемента концентрације 1000 mgdm^{-3} (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl и Zn) у HNO_3 . За одређивање церијума (Ce) коришћен је појединачни стандардни раствор за ICP анализу, концентрације 1000 mgdm^{-3} Ce, припремљен у 5% HNO_3 (Cerium ICP Standard Solution, ROTI®Star, Carl ROTH), док је за одређивање сумпора (S) коришћен појединачни стандардни раствор за ICP анализу, концентрације 1000 ppm (Sulfur, ICP Standard Solution; GFS Chemicals). Коришћене су нутриционе агар плоче из Торлака (Институт за вирусологију, вакцине и серуме, Београд, Србија); микроорганизми *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Candida albicans* ATCC 2091 су сојеви из микробиолошке лабораторије Технолошког факултета у Лесковцу, стерилни целулозни дискови пречника 9 mm од LLG Labware (Meckenheim, Germany). Дублеков модификовани орао медијум (DMEM), фетални говеђи серум (FBS), стабилан глутамин, раствор антибиотика и антимикотика, трипсин-EDTA и Ханков балансирани раствор



соли (HBSS) (Capricorn Scientific, Germany); 2-пропанол и етанол (HPLC квалитета) (Fisher Scientific, Germany), 4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолијум бромид (MTT) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Germany), две ћелијске линије сисара: MDCK (Madin-Darby псеће ћелије бубрега) и HeLa S3 (ћелије рака грлића материце код људи) (ATCC (American Type Culture Collection, USA); говеђи серумски албумин (BSA), диклофенак-натријум и фосфатни пуферни раствор (PBS, pH 6,3).

Биљни материјал - листови малине (*Rubus idaeus* L.) и купине (*Rubus spp.*) са подручја Плане (географска ширина 22°19'48.39'', географска дужина 42°49'28.45'' и надморска висина 1550 m), у близини Црне Траве (Србија), као и гајене јагоде (*Fragaria x ananassa* Duch.) сорте Mount Everest (пењачица) са подручја села Бадинце (географска ширина 42°58'16'', географска дужина 22°0'22'' и надморска висина 228 m) у околини Лесковца (Србија). За припремање екстракта коришћена је редестилована вода. Примењени реагенси су аналитичке чистоће и нису даље пречишћавани.

3. 1.1 Биљни материјал

Јагода, гајена у пластенику висине 2,5 m (Бадинце, Лесковац, југоисточна Србија), покривеном полиетиленском фолијом (0,15 mm дебљине; Ginegar Plastic Products-Ltd.) са које су убрани листови почетком маја 2013. године, у периоду цветања. Листови дивље малине и купине убрани су на подручју Црне Траве, надморске висине 1550 m, почетком августа 2017. године, након периода цветања. Сви узорци су сушени у мраку, при сталном протоку ваздуха и, непосредно пре анализе, самлевени у лабораторијском електричном млину ("BRAUNAROMATIC KSM2").

3.2 Екстракција

Екстракција биоактивних материја из биљног материјала извршена је употребом редестиловане воде као растварача. Водени екстракти добијени су методом мацерације на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања.

3.2.1 Мацерација

Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (по 2 g) екстрахован је редестилованом водом (40 cm³) у току 120 min на собној температури од 25 °C (хидромодул 1:20 m/v). Након екстракције, биљни материјал је одвојен од течног екстракта филтрирањем уз вакуум на Bichner-овом левку. Након филтрирања, узет је аликвотни део испитиваног екстракта и сушен до константне масе на температури 105 °C, а принос сувог остатка



рачунат на основу садржаја сувог остатка. До даље анализе, екстракти су чувани на -20°C .

3.2.2 Екстракција уз рефлукс

Уситњен и хомогенизован биљни материјал (по 10 g) екстрахован је редестилованом водом (200 cm^3 , хидромодул 1:20 m/v) уз рефлукс на температури кључања, у току 120 min. Суви остатак је одређен на начин описан у претходном делу. Добијени екстракти су до даљег такође чувани на -20°C .

3.3 Индуковано куплована плазма – оптичка емисиона спектроскопија (ICP-OES)

Мерења су вршена на ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry, ARCOS FHE12, SPECTRO, Germany) у складу са упутствима произвођача. Радни услови ICP-OES инструмента и параметри за одређивање концентрације одабраних елемената су дати у табели 4.

Табела 4. Оперативни услови рада уређаја

Снага плазме (W)	1400
Проток гаса ($\text{dm}^3\text{min}^{-1}$)	
-Coolant	13
-Auxiliary	0,80
Тип распршивача	Cross flow
Проток распршивача ($\text{dm}^3\text{min}^{-1}$)	0,95
Правац посматрања плазме	Аксијални

Припрема узорка за ICP-OES анализу

У нормалном суду од 10 cm^3 одмерен је узорак тачне запремине. Нормални суд је допуњен дестилованом водом (HPLC grade) до црте. Узорак је филтриран помоћу филтера величине пора $0,45\text{ }\mu\text{m}$ и подвргнут ICP-OES анализи.

Реагенси и стандардни раствори



Као носећи гас коришћен је Аргон 5,0 (чистоће 99,999%), док је за припрему калибрационих раствора коришћен мултиелементарни стандардни раствор. Припрема калибрационих раствора за испитивање одабраних елемената вршена је разблаживањем стандардних раствора, тако да су концентрације стандарда за израду калибрационих дијаграма биле у опсегу очекиваних концентрација испитиваних елемената. У табели 5 приказане су одабране таласне дужине детекције за сваки елемент, корелациони коефицијент (R), опсег линеарности (OL), односно лимит детекције (LD).

Табела 5. Параметри калибрационе праве за одређивање елементе: λ , R, OL и LD

Елемент	Таласна дужина детекције, λ (nm)	Корелациони коефицијент, R	Опсег линеарности, OL (лимит детекције, LD) (mgdm ⁻³)
As	189,042	0,99982	$2,55 \times 10^{-3}$ –3,60
	197,262	1,00000	$8,25 \times 10^{-3}$ –2,40
Ag	328,068	0,99995	$1,66 \times 10^{-3}$ –12,00
B	182,641	0,99999	$7,37 \times 10^{-3}$ –12,00
	249,773	0,99999	$6,43 \times 10^{-3}$ –12,00
Ba	233,527	0,99998	$1,15 \times 10^{-4}$ –12,00
Bi	190,241	0,99991	$3,53 \times 10^{-3}$ –12,00
	223,061	0,99996	$3,68 \times 10^{-3}$ –12,00
Ca	183,801	1,00000	1,6–12,00
	396,847	1,00000	$1,26 \times 10^{-2}$ –2,41
Ce	418,660	0,99995	$1,2 \times 10^{-3}$ –60
Cd	214,438	0,99989	$1,11 \times 10^{-4}$ –2,40
Co	228,616	0,99980	$3,27 \times 10^{-4}$ –12,00
Cr	283,563	0,99998	$4,35 \times 10^{-4}$ –12,00
Cu	224,700	0,99999	$9,07 \times 10^{-4}$ –12,00
	324,754	0,99999	$2,59 \times 10^{-4}$ –12,00
Fe	259,941	0,99995	$1,99 \times 10^{-3}$ –12,00
Hg	184,950	0,99992	$1,92 \times 10^{-4}$ –12,00
	194,227	0,99994	$5,79 \times 10^{-4}$ –12,00
	253,652	0,99986	$2,02 \times 10^{-3}$ –12,00
In	325,609	1,00000	$4,00 \times 10^{-3}$ –12,00
K	404,721	0,99996	$1,56 \times 10^{-1}$ –60,00



Li	323,261	1,00000	$7,98 \times 10^{-2}$ –12,00
	670,780	0,99997	$5,74 \times 10^{-5}$ –1,20
Mg	285,213	0,99996	$2,06 \times 10^{-3}$ –12,10
Mn	257,611	0,99997	$1,05 \times 10^{-4}$ –12,00
Na	330,237	0,99995	$7,98 \times 10^{-1}$ –12,00
	589,592	1,00000	$5,83 \times 10^{-3}$ –1,200
Ni	231,604	0,99994	$4,74 \times 10^{-4}$ –12,00
P	214,914	0,99995	0–120,00
Pb	220,353	0,99998	$1,60 \times 10^{-3}$ –12,00
S	180,731	1,00000	$2,9 \times 10^{-3}$ –24,00
Si	251,612	0,99998	$1,24 \times 10^{-3}$ –60
	288,158	0,99998	$5,82 \times 10^{-3}$ –60
Sr	407,781	1,00000	$1,21 \times 10^{-4}$ –2,41
Tl	190,864	0,99999	$1,72 \times 10^{-3}$ –12,00
Zn	213,856	0,99997	$8,2 \times 10^{-5}$ –12,00
Ge	206,866	0,99987	0,00565–24,00
Nb	309,412	0,99977	$1,526 \times 10^{-3}$ –24,0
Sn	242,949	0,99997	$6,381 \times 10^{-3}$ –18,00
Ta	240,053	0,99979	0,00138–24,00
Ti	334,187	0,9999	$8,07 \times 10^{-5}$ –18,00
V	292,402	0,9996	$1,578 \times 10^{-3}$ –24,00
W	207,911	0,99992	$3,028 \times 10^{-3}$ –36,00

3.4 Течна хроматографија – масена спектрометрија (UHPLC-MS/ESI)

Течно-масена хроматографска анализа екстракта и супернатаната наночестица је извршена на Thermo Scientific систему течне хроматографије (UHPLC) у комбинацији са LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) спектрометром опремљеним ElectroSpray Ionization (ESI) јонизационом техником. Екстракти и супернатанти добијени центрифугирањем суспензија AgNPs-E (10 min на 13500 rpm и собној температури), подвргнути су UHPLC-MS анализи како би се предвидела која врста једињења највише учествује у редукцији Ag^+ , као и стабилизацији AgNPs-E. Инструмент је контролисан и подаци анализирани помоћу



софтвера Xcalibur (verzija 2.2 SP1.48) и LCQ (verzija 2.7.0.1103 SP1). За хроматографско раздвајање коришћена је колона Hypersil gold C18 (50×2.1 mm, $1.9 \mu\text{m}$, Thermo Fisher Scientific), а 0,1% мравља киселина у води (А) и 0,1% мравља киселина у метанолу (Б), као мобилна фаза. Градијентна анализа, уз проток од $0,250 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, састојала се у следећем: компонента Б се повећавала 10 – 30% током 0 – 2 минута, до 35% током 2 – 4 минута, до 40% током 4 – 5 минута, до 50% током 5 – 8 min, на 80% током 8 – 9 min, на 90% током 9 – 11 min, одржавала се на 90% током 11 – 12 min, враћајући се на 10% током 12 – 12,1 min и одржавала на 10% током 12,1 – 20 min; запремина инјектирања била је $8 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$, температура колоне 25°C , а хроматограми су регистровани и DAD детектором на 230, 280, 360 и 430 nm. Масено-спектрометријска анализа је спроведена у негативном режиму, а параметри ESI извора били су: напон извора 4,5 kV, напон капиларе 41,0 V; напон сочива цеви 95,4 V и температура капиларе 350°C ; проток гасова за омотач и помоћног гаса (N_2) износили су 32 и 8 (произвољне јединице) уз потпуно скенирање у опсегу (130 – 1000 m/z). Нормализована енергија судара у CID ћелији је постављена на 25 eV.

3.5 Синтеза наночестица сребра и злата

3.5.1 Синтеза наночестица сребра

Водени раствор сребро нитрата, AgNO_3 (250 cm^3 , 0,001 M), помешан је са воденим екстрактима листова купине, малине и јагоде, добијених мацерацијом и рефлукс екстракцијом, у молском односу 1:1 (средња моларна маса екстракта $\sim 460 \text{ g mol}^{-1}$) (Stevanović et al., 2019). Синтеза наночестица сребра (AgNPs-E) је изведена на собној температури и температури кључања (уз рефлукс). Након синтезе, извршена је дијализа добијених суспензија како би се уклонили нитрати. Дијализа је спроведена у лабораторијској чаши, у мраку, уз свакодневну промену редестиловане воде. У врећицама за дијализу (Spectra/Por Biotech; cellulose ester; MWCO 100000) дијализирани су узорци запремине 20 cm^3 , потопљени у 500 cm^3 редестиловане воде на собној температури. Редестилована вода је мењана до нестанка нитратног пика на $\sim 200 \text{ nm}$ у UV-Vis спектрима суспензија. Концентрације синтетисаних наночестица сребра одређене су испаравањем растварача из 2 cm^3 аликвотног дела до константне масе на 105°C .



3.5.2 Синтеза наночестица злата

Синтеза наночестица злата (AuNPs-E) извршена је мешањем добијених екстраката са воденим раствором (250 cm^3) трихидрат тетраклороауринске (III) киселине ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$) до коначног молског односа 1:1. Синтеза AuNPs-E изведена је на собној температури и температури од 80°C уз рефлукс. Концентрације синтетисаних наночестица одређене су испаравањем растварача из 2 cm^3 аликвота до константне масе на 105°C .

3.6 Инструменталне методе карактеризације наночестица сребра и злата

3.6.1 UV-Vis спектрофотометрија наночестица сребра и злата

Екстракти добијени из биљног материјала описаним методама снимани су на спектрофотометру Varian Cary-100 Conc. (Varian, Аустралија) у опсегу таласних дужина $200 - 800 \text{ nm}$ одмах након припреме. Ток синтезе AgNPs-E и AuNPs-E праћен је и анализиран на овом инструменту тако што су 20 пута разблажене реакционе смеше периодично снимане у наведеном опсегу таласних дужина. Коришћене су кварцне кивете са оптичким путем од 1 cm , на собној температури. Обрада података обављена је помоћу софтвера Cary UV-Conc (Copyright[®], Varian 1999), интегрисаног у Windows XP OS платформу.

3.6.2 FT-IR спектрофотометрија наночестица сребра и злата

Инфрацрвени спектри биљних екстраката и суспензија синтетисаних AgNPs-E и AuNPs-E добијени су методом пресовања узорака, претходно сушених на 50°C , у пастилама калијум-бромида. Спектри су снимани на BOMEM MB-100 (Hartmann & Braun, Канада) FT-IR спектрофотометру, у комбинацији са стандардним deuterated triglycine sulfate/KBr детектором при резолуцији 2 cm^{-1} , у опсегу $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, са припремљеном референтном пастилом са чистим KBr (150 mg). Обрада података извршена је коришћењем софтверског пакета Win-Bomem EasyTM 3.01 C Level II (Copyright© 1991–1994, Galactic Industries Corporation под Windows XP OS платформом).



3.6.3 XRD анализа наночестица сребра и злата

Узорци синтетисаних AgNPs-E и AuNPs-E су осушени и у виду праха снимани у Bragg-Brentano $\theta:2\theta$ геометрији коришћењем конвекционалног прашкастог дифрактометра Rigaku MiniFlex 600, применом CuK α зрачења ($\lambda_{\text{CuK}\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$, секундарни графитни монохроматор, уз подешавања генератора на 40 kV и 15 mA). Као екстерни стандард за калибрацију положаја и ширине пика коришћени су Si 640 SRM и LaB6. XRD спектри су снимљени у опсегу 2θ од $15 - 90^\circ$, са величином корака од 0.03° и временом експозиције од 2 s/step.

3.6.4 SEM микроскопија наночестица сребра и злата

Скенирајућа електронска микроскопија извршена је помоћу TESCAN MIRA 3 XMU емисионог скенирајућег електронског микроскопа (FE-SEM), који снима на 20 keV, у циљу одређивања морфолошких карактеристика синтетисаних наночестица. Узорци су припремљени у виду праха и пре анализе обложени танким слојем злата применом уређаја за наношење методом распршивања (Polaron SC503, Fisons Instruments).

3.6.5 EDX анализа наночестица сребра и злата

За EDX анализу узорци су уситњени у прах и премазани карбонском траком на носачима за електронску микроскопију. Сlike су добијене под увећањима од $5000\times$, $10000\times$, $25000\times$ и $50000\times$, док је сама анализа изведена при увећању од $2500\times$, при убрзању снопа од 10.0 kV на удаљености од 10 mm, коришћењем ChemiSem система компаније ThermoFisher. Сlike су снимљене помоћу Thermo Fisher Apreo 2 C SEM.

3.6.6 DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица сребра и злата

Расподела величина честица и zeta-потенцијал AgNPs-E и AuNPs-E мерени су коришћењем Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern, UK). Добијени подаци из инструмента су анализирани коришћењем софтвера Malvern Zetasizer. Узорци су мерени три пута на 25°C .

3.7 Припрема хидрогелова са наночестицама сребра и злата

За припрему хидрогела са екстрактима и синтетисаним наночестицама сребра и злата коришћен је Carbomer 940 у концентрацији 1% (w/w). За неутрализацију хидрогела коришћен је 10% (w/w) водени раствор триетаноламина (TEA). Хидрогел је постепено додат у чашу у којој је претходно унета редестилована вода, уз непрекидно мешање на



500 грт помоћу магнетне мешалице. За формирање гела растворено је и 4 cm^3 глицерина и 1 cm^3 полипропилен гликола. У хомогену дисперзију гела постепено је додаван 10% (w/w) водени раствор триетаноламина (ТЕА), који је припремљен непосредно пре употребе. Затим су екстракти и синтетисане наночестице сребра и злата полако додавани мешањем на магнетној мешалици. Формирани хидрогелови су коришћени за анализе 24 сати након припреме. Стабилност је проверавана у унапред утврђеним временским интервалима током 12 месеци складиштења на собној температури ($T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$) и у фрижидеру на $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. У табели 6 је приказан састав припремљених хидрогелова.

Табела 6. Састав припремљених хидрогелова на бази карбомера 940

Компонента	Функција	Финална концентрација
Карбомер 940	Гелирајући агенс (полиакрилна киселина)	1% (w/w)
Триетаноламин 10%(w/w)	Неутралишући агенс	1 cm^3
Глицерин	хумектант / хидратантно средство	4% (w/w)
Полипропилен гликол	пластификатор / модификатор текстуре	1% (w/w)
Биљни екстракти		
Наночестице сребра Наночестице злата	Биоактивни агенс	$0,1 \text{ mgcm}^{-3}$
Пречишћена вода (дејонизована)	Континуална фаза / растварач	Додато до 100%

3.8 Физичко-хемијска карактеризација хидрогелова

Физичко-хемијска карактеризација хидрогелова обухвата органолептичко праћење и проверу стабилности хидрогелова (хомогеност, рН вредност, вискозност и електрична проводљивост) у правилним временским интервалима током 12 месеци. Стабилност је проверавана за хидрогелове који су чувани на собној температури од $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ и у фрижидеру на $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Провера рН вредности хидрогелних формулација је урађена коришћењем рН метра (Hanna Instruments HI 2211 рН/mV/C). Одређивање електричне проводљивости извршено је коришћењем кондуктометра (Hanna instruments b HI N8820 N). Одређивање привидне вискозности извршено је коришћењем вискозиметра



(FungilabVisco Basic P Plus L V60003), са вретеном бр. 5 (пречник 2,1 cm), при брзини од 50 rpm.

Процена физичке стабилности гел формулација - тест центрифугирања

Узорци гелова (5 g) стављени су у стаклене епрувете запремине 10 cm³ и центрифугирани три пута по 15 минута при 3000 rpm. Узорци су центрифугирани у лабораторијској центрифуги (LC 320, Libra, Železniki, Словенија) на температури од $T = 20 \pm 2$ °C (собна температура), након 24 сата од припреме формулација, а затим током периода складиштења до 12 месеци. Сваки узорак је визуелно прегледан ради уочавања евентуалних промена, односно појаве фазне сепарације.

Статистичка анализа

Статистичка анализа података спроведена је у софтверу JМП® Pro 18. Најпре су проверени услови за примену анализе варијансе (ANOVA), укључујући нормалност расподеле података и хомогеност варијанси између група. Након потврде испуњености претпоставки, примењена је ANOVA ради испитивања постојања статистички значајних разлика између средњих вредности посматраних група.

У случајевима када је ANOVA показала статистички значајан ефекат ($p < 0,05$), спроведена је *post hoc* анализа применом Tukey–Kramer теста како би се идентификовале конкретне разлике између парова група.

3.9 Биолошка активност

3.9.1 Антиоксидативна активност – DPPH тест

За одређивање антиоксидативне активности 1 cm³ етанолног раствора DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил хидрат) радикала (3×10^{-4} mol dm⁻³) додат је у 2,5 cm³ раствора AgNPs-E и AuNPs-E припремљених у различитим концентрацијама (0,001 – 0,1 mg cm⁻³). Реакционе смеше су потом инкубирале 20 min на собној температури у мраку, а након тога је мерена апсорбанца на 517 nm. Апсорбанца је такође мерена и за раствор DPPH радикала, разблаженог у одговарајућој пропорцији (1,0 cm³ раствора DPPH радикала разблаженог са 2,5 cm³ етанола – „контрола“), као и апсорбанца суспензија AgNPs-E и AuNPs-E без додавања DPPH радикала (2,5 cm³ суспензије разблажене са 1,0 cm³ етанола „blank“). На исти начин је изведен DPPH тест и за екстракте који се користе у синтезама AgNPs-E и AuNPs-E. Активност неутралисања



слободних радикала израчунава се према формули (Cvetković et al, 2008; Stanojević et al., 2013):

$$\text{Степен неутралисања DPPH радикала (\%)} = 100 - [(A_U - A_B) \times (100/A_K)] \quad \text{јед. 1.}$$

где је:

A_U = апсорбанција „узорка“

A_B = апсорбанција „blank“

A_K = апсорбанција „контроле“.

За одређивање антиоксидативне активности хидрогелова, $0,3 \text{ cm}^3$ етанолног раствора DPPH радикала концентрације $3 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ додато је у $0,75 \text{ cm}^3$ раствора хидрогела у различитим концентрацијама ($0,001 - 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$). Припремљене смеше су инкубиране 20 минута на собној температури у мраку. Након 20 минута извршено је мерење апсорбане смеше на 517 nm . Као и код синтетизованих наночестица, и код хидрогелова је мерена апсорбанца раствора DPPH радикала разблаженог у адекватној пропорцији ($0,3 \text{ cm}^3$ раствора DPPH разблаженог са $0,75 \text{ cm}^3$ етанола – „контрола“) и апсорбанца раствора хидрогела без додавања DPPH радикала ($0,75 \text{ cm}^3$ раствора хидрогела разблажен са $0,3 \text{ cm}^3$ етанола – „blank“).

3.9.2 Антибактеријска активност екстракта и наночестица сребра и злата

За проверу антибактеријске активности коришћено је десет микроорганизама, при чему су примењене две методе испитивања: микродилуциона и диск дифузиона метода. Коришћени су следећи микроорганизми: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus luteus* и *Candida albicans* ATCC 2091, који су део колекције микроорганизама лабораторије за микробиологију Технолошког факултета у Лесковцу.

Микродилуциона метода. Провера антимикробне активности наночестица сребра извршено је одређивањем минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне микробицидне (MMC) (бактерицидне/фунгицидне, MBC/MFC) концентрације, према протоколима Клиничко-лабораторијског стандардног института. Ова метода се изводи на микротитарским плочама. Након инокулације, микротитарске плоче су инкубиране



на 37 °C током 24 сати, а потом су резултати забележени коришћењем EZ 400 Elisa читача микроплоча (Biochrom, microplate reader (Biochrom, UK).

Диск-дифузиона метода. За експеримент са наночестицама злата микроорганизми су култивисани на погодном медијуму: хранљиви агар ("Torlak", Belgrade, Serbia) за бактерије и Sabourard maltose агар ("Torlak", Belgrade, Serbia) за гљиве. Медијуми су стерилисани у аутоклаву на 121 °C током 15 минута. Суспензија је са културом припремљена током ноћи и модулисана са 0,5 McFarland стандардом. Суспензија инокулума од 0,1 cm³ додата је у 10 cm³ медијума и потом пребачена у Петријеве плоче. Стерилисани дискови филтер папира (пречника 0,9 cm, Schleicher & Schuell) стављени су на површину инокулисаних медијума и импрегнирани са 6×10⁻² cm³ узорака. Инкубација плоча је вршена 24 сата на 37 °C за бактерије и 48 сати на 25 °C за квасац. Антимикробна активност је представљена као пречник зона инхибиције изражена у cm.

3.9.3 *In vitro* тестирање цитотоксичности наночестица сребра

За *in vitro* тестирање цитотоксичности коришћене су две ћелијске линије сличне епителу: MDCK (Madin-Darby псеће ћелије бубрега) and HeLa (ћелије рака грлића материце код људи). Ове ћелијске линије се најчешће користе као модели за епителне ћелије. Ћелије обе ћелијске линије су култивисане у DMEM са додатком 10% FBS, 2 mM стабилног глутаминa и 1% раствора антибиотик-антимикотик (комплетан DMEM) на 37 °C у влажној амтосфери која садржи 5% CO₂.

3.9.3.1 *In vitro* тестирање цитотоксичности наночестица сребра

Наночестице сребра синтетисане на собној (AgNPs-E-CT) и температури кључања (AgNPs-E-TK) тестиране су при различитим концентрацијама које су припремљене разблаживањем првобитно синтетисане суспензије концентрације 0,1 mgcm⁻³ у медијуму за ћелијску културу (комплетни DMEM). Активност AgNPs-E испитивана је у растворима следећих концентрација: 0,05, 0,025, 0,015, 0,01, 0,005 и 0,002 mgcm⁻³.

HeLa и MDCK ћелије су одвојене коришћењем раствора трипсин-EDTA и ћелије су пребројане коришћењем методе искључења трипан плаве боје. Ћелије су засејане у плоче са 96 бунарчића (Greiner Bio-One, Germany) са густином од 20 000 ћелија по бунарчићу. После 24 h ћелијске култивације у стандардним условима културе, 0,1 cm³ раствора AgNPs-E (са концентрацијама које су биле двоструко ефикасније) је додато ћелијама (култивисаним у 0,1 cm³ комплетног DMEM-а по бунарчићу) у испитиваним коначним концентрацијама као што је описано у претходном одељку. Ћелије



култивисане у стандардном медијуму за ћелијску културу (комплетан DMEM), без екстракта (нетретиране ћелије) под истим условима, коришћене су као контроле. Свака концентрација AgNPs-E, као и контрола, тестирана је у четири до осам понављања. Ћелије су култивисане са AgNPs-E-CT и AgNPs-E-TK током наредна 24 h у стандардним условима ћелијске културе.

3.9.3.1.1 MTT тест

После 24 сата инкубације, вијабилност ћелија је процењена MTT тестом. Ћелије су прво испране физиолошким раствором фосфатног пуфера (PBS), а затим је додато $0,1 \text{ cm}^3$ MTT раствора (концентрација 1 mgcm^{-3}). Ћелије су инкубиране са MTT наредна 3 h, након чега је уследило растварање формираних кристала формазана са $0,1 \text{ cm}^3$ 2-пропанола по бунарчићу. Количина формираног формазана је у директној корелацији са процентом живих ћелија. Апсорбанција раствореног формазана је мерена коришћењем Multiskan Ascent Plate Reader (ThermoLab Systems, Finland) на таласној дужини од 540 nm са таласном дужином корекције од 650 nm. За сваку испитивану концентрацију, као и за контролу, израчунате су средње вредности апсорбанције. Резултати су изражени као проценат виталности ћелије који је израчунат према формули:

$$\text{Вијабилност ћелије} = A_s/A_0 \times 100 \quad \text{јед. 2}$$

где су:

A_s = апсорбанца третираних ћелија

A_0 = апсорбанца нетретираних ћелија

За контролну културу (нетретиране ћелије), сматра се да је вијабилност ћелија 100 %.

Статистичка анализа

Статистички значајне разлике између ефеката AgNPs-E-CT и AgNPs-E-TK, као и различитих ћелијских линија, анализиране су једносмерном анализом варијансе (ANOVA) са вредностима апсорбанције из најмање два независна експеримента. Вредност $p < 0,05$ сматрана је статистички значајном.

3.9.4 *In vitro* анти-инфламаторна активност хидрогелова

У циљу провере анти-инфламаторне активности хидрогелова, спроведен је *in vitro* тест који је у складу са протоколом Lavanya и сарадника (2010), а који подразумева тест



инхибиције денатурације протеина. Узорци са наночестицама сребра (X-KP CT, X-KM CT) и наночестицама злата (X-KP CT И X-KP 80) који су коришћени за тестирање ($0,1 \text{ mgcm}^{-3}$) помешани су са 5% воденим раствором албумина из говеђег серума (BSA), који је помешан са дестилованом водом као контрола и диклофенак-натријум као позитивна контрола ($0,1 \text{ mgcm}^{-3}$). Добијене смеше су инкубиране на температури од 37°C , након чега је уследило излагање на температури од 57°C . Након хлађења, растворима је додат физиолошки раствор са фосфатним пуфером (PBS, pH 6,3), а апсорбанца је мерена на 340 nm коришћењем читача микроплоча Multiskan Ascent No354 ELISA (ThermoLabsystems, Finland). Након извршеног теста, израчунат је проценат инхибиције денатурације протеина у поређењу са контролом (100% денатурације протеина), а након тога извршено поређење са диклофенак-натријум.

3.9.5 Фактор заштите од сунчевог зрачења (SPF) и UV параметри хидрогелова

Фактор заштите од сунчевог зрачења (SPF) формулисаних хидрогелова одређен је применом *in vitro* спектрофотометријске методе помоћу UV-Vis спектрофотометра Varian Cary-100 Conc. (са Cary UV-Conc софтвером, Varian, 1999). Слој хидрогела дебљине 4 mm равномерно је нанет помоћу граничника између две кварцне плоче и одмах анализиран. Спектри су снимани у целом опсегу таласних дужина (200 – 800 nm); део апсорпционих спектра у опсегу 290 – 400 nm, који обухвата UVA и UVB подручје, накнадно је коришћен за израчунавање SPF вредности и осталих UV параметара (критична таласна дужина λ_c , UVA Star вредности, индекс безбедности наночестица NS и UVA/UVB однос) у складу са утврђеним математичким моделима, коришћењем програма ORIGIN 2019b Sample Data. Параметри су рачунати и одређивани по методама описаним у публикацијама Diffey (1994), Diffey и сарадници (2000) и Dutra и сарадници (2004):

Одређивање SPF фактора: Апсорбанце се одређују са UV-Vis спектра узорака на унапред задатим таласним дужинама (од 290 nm до 320 nm, у интервалима од 5 nm) и SPF фактор се рачуна по формули

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad \text{јед. 3}$$



у којој је CF корекциони фактор ($= 10$), $Abs(\lambda)$ – апсорбанца хидрогела на одређеној таласној дужини, $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ – литературне константне вредности за сваку од таласних дужина одређене од стране Sayre и сарадника (1979). Узорци су упоредо тестирани разблаживањем хидрогелова водом (10 пута) и снимањем спектра у спектрофотометријској кивети дужине оптичког пута 10 mm. Вредности SPF су рачунате у оба случаја коришћењем јед. 3, уз корекције због разблажења и разлике у дужини оптичког пута – вредности одређене из слоја хидрогела су множене фактором 2,5, док су вредности одређене из раствора множене фактором 10.

Критична таласна дужина (λ_c) одређена је методом *Broad Spectrum Rating* – интеграцијом спектра у области 290 – 400 nm, при чему се одређује таласна дужина испод које је 90% површине спектра (λ_c) по формули

$$\int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda) d\lambda = 0,9 \int_{290}^{400} A(\lambda) d\lambda \quad \text{јед. 4}$$

коришћењем програма ORIGIN 2019b Sample Data. У горњој формули је са $A(\lambda)$ означена апсорбанца на одређеној таласној дужини (λ). На основу одређених вредности критичних таласних дужина додељен је индекс безбедности наночестица (NS), према критеријумима дефинисаним у литератури (Diffey, 2000).

UVA/UVB однос је одређен спектрофотометријски према формули

$$\frac{\int_{320}^{400} A(\lambda) d\lambda / \int_{320}^{400} d\lambda}{\int_{290}^{320} A(\lambda) d\lambda / \int_{290}^{320} d\lambda} \quad \text{јед. 5}$$

на основу површина спектра хидрогелова интегралених у наведеним областима таласних дужина коришћењем програма ORIGIN 2019b Sample Data. На основу добијених односа додељене су UVA Star вредности (*UVA Star Rating*) према критеријумима описаним у литератури (Diffey, 2000).



4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1 Синтеза и карактеризација наночестица сребра

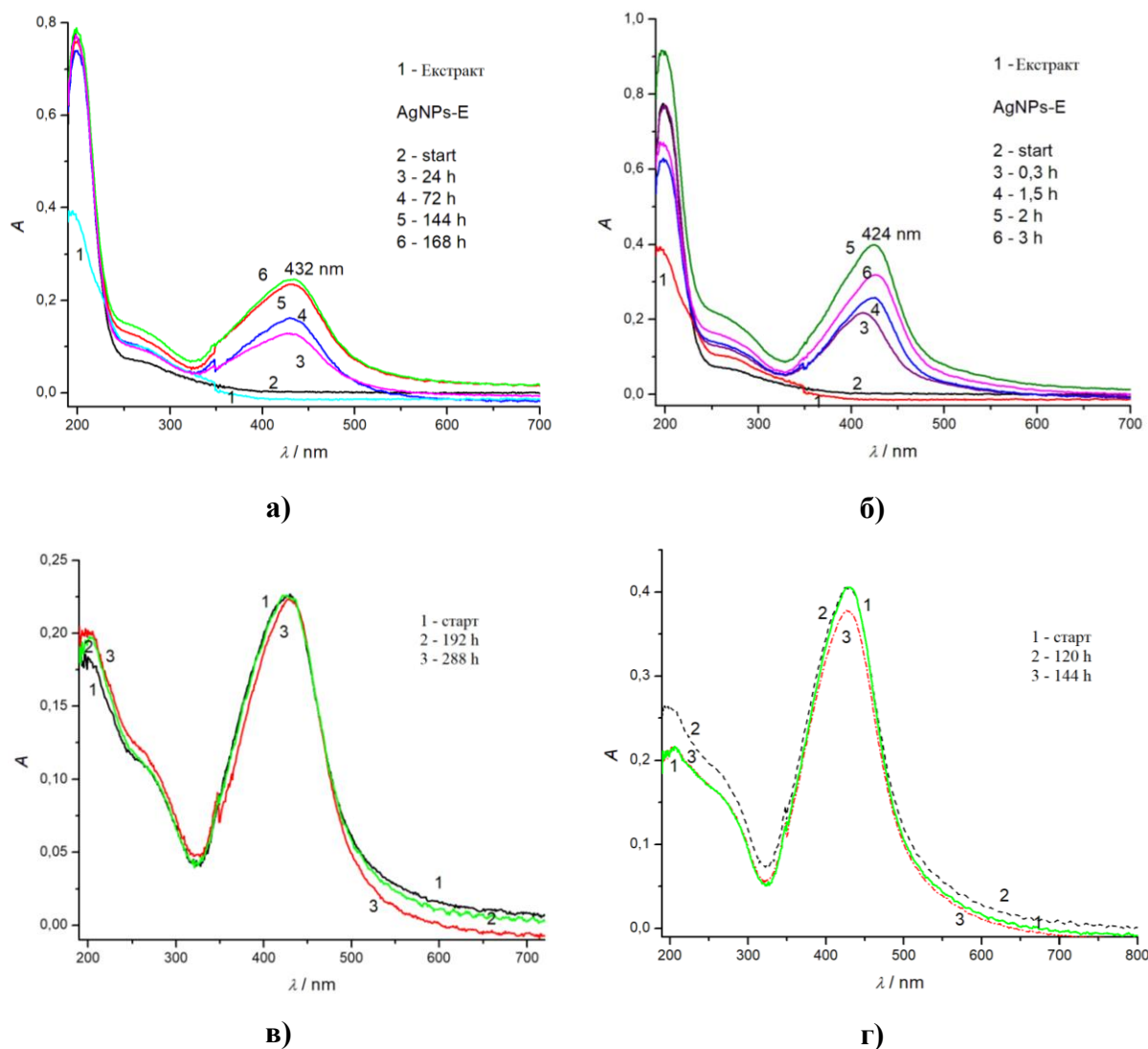
Водени екстракти добијени мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, из листова гајене јагоде, дивље малине и дивље купине, су коришћени као редукциони и стабилизациони агенси у синтези наночестица сребра (AgNPs-E) и злата (AuNPs-E). Синтезе су вршене на собној температури (СТ) и температури кључања (ТК) реакционе смеше уз рефлукс. Синтеза и стабилност наночестица током дужег временског периода су праћени UV-Vis спектрофотометријом, која је послужила и као први корак у карактеризацији синтетисаних наночестица; наночестице су окарактерисане и другим адекватним спектроскопским техникама, а детаљи су дати у даљем тексту.

4.1.1 UV-Vis спектрофотометрија екстраката и наночестица сребра

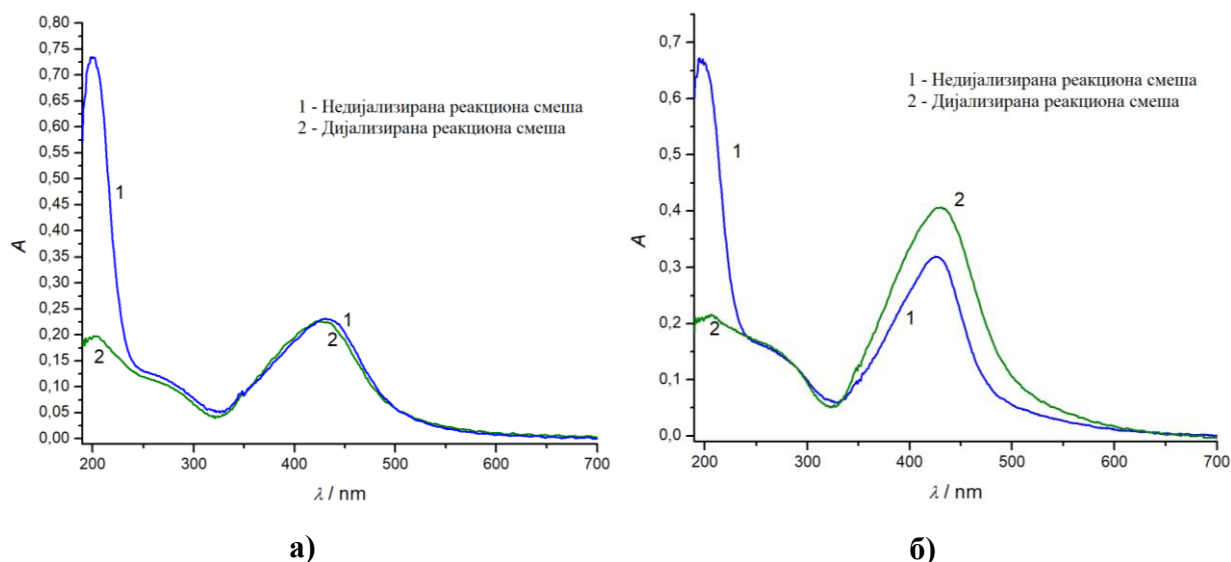
Способност редукције Ag^+ јона воденим екстрактима из листова јагоде, купине и малине приликом синтезе наночестица, као и њихова стабилност током времена, праћени су UV-Vis спектрофотометријом. Ова метода се најчешће користи у циљу праћења тока синтезе и прелиминарне карактеризације синтетисаних наночестица.

Сам ток синтезе могуће је визуелно пратити преко промене боје реакционе смеше од жућкасте до браон боје. Апсорпциони спектри AgNPs-E синтетисаних употребом споменутих екстраката, под различитим условима, снимани у области таласних дужина 190 – 800 nm приказани су на сликама **12 – 21**. На сликама су истовремено приказани спектри реакционих смеша након дијализе и уклањања нитратних јона из раствора, као и спектри реакционих смеша након одређеног времена складиштења на собној температури у мраку (провера стабилности синтетисаних наночестица).

Електронски апсорпциони спектри AgNPs-E синтетисаних екстрактом из листа јагоде приказани су на сликама **12** и **13**.

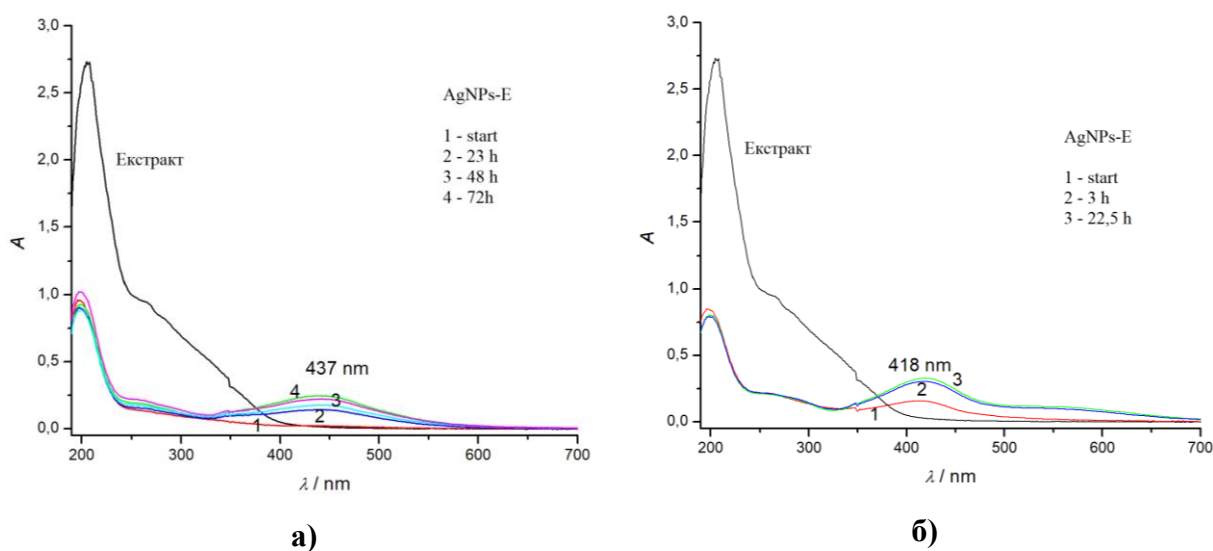


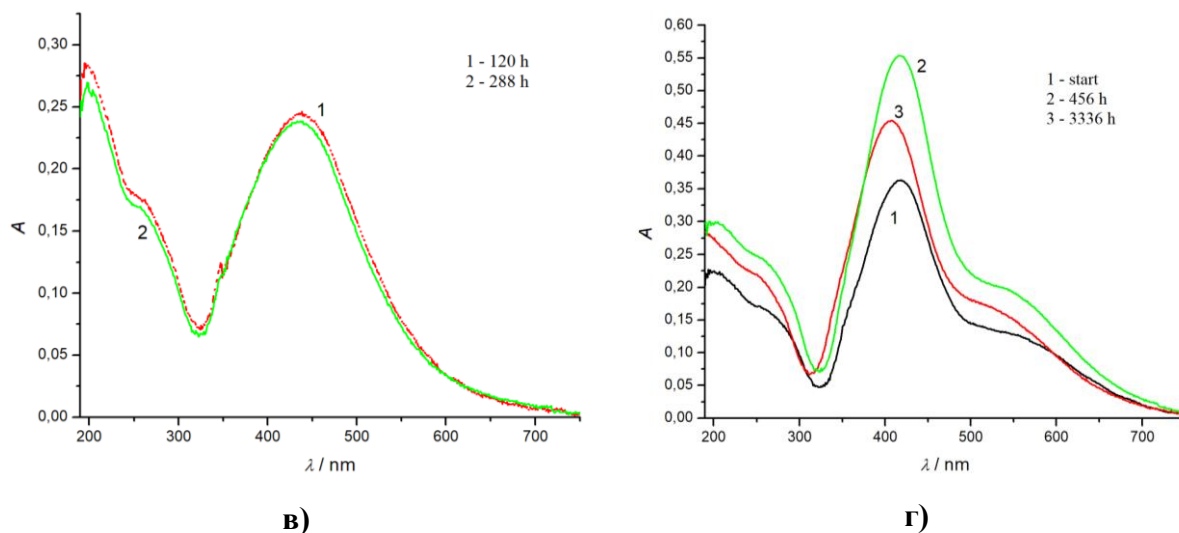
Слика 12. Синтеза и провера стабилности синтетисаних AgNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри екстракта из листа јагоде добијеног мацерацијом на собној температури и тока синтезе AgNPs-E на собној температури (а), и температури кључања (б); провера стабилности AgNPs-E синтетисаних на собној температури (в) и температури кључања (г)



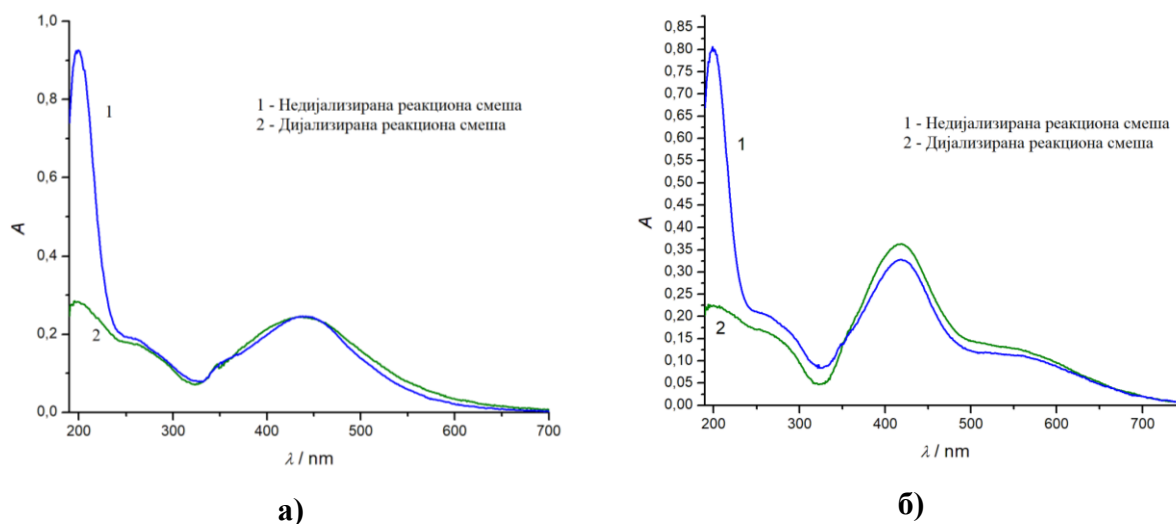
Слика 13. Ефекат дијализе: UV-Vis спектри дијализованих и недијализованих AgNPs-E синтетисаних на собној температури (а) и температури кључања (б). AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта добијеног мацерацијом на собној температури из листа гајене јагоде

Електронски апсорпциони спектри AgNPs-E синтетисаних екстрактом из листа малине приказани су на сликама 14 – 17.

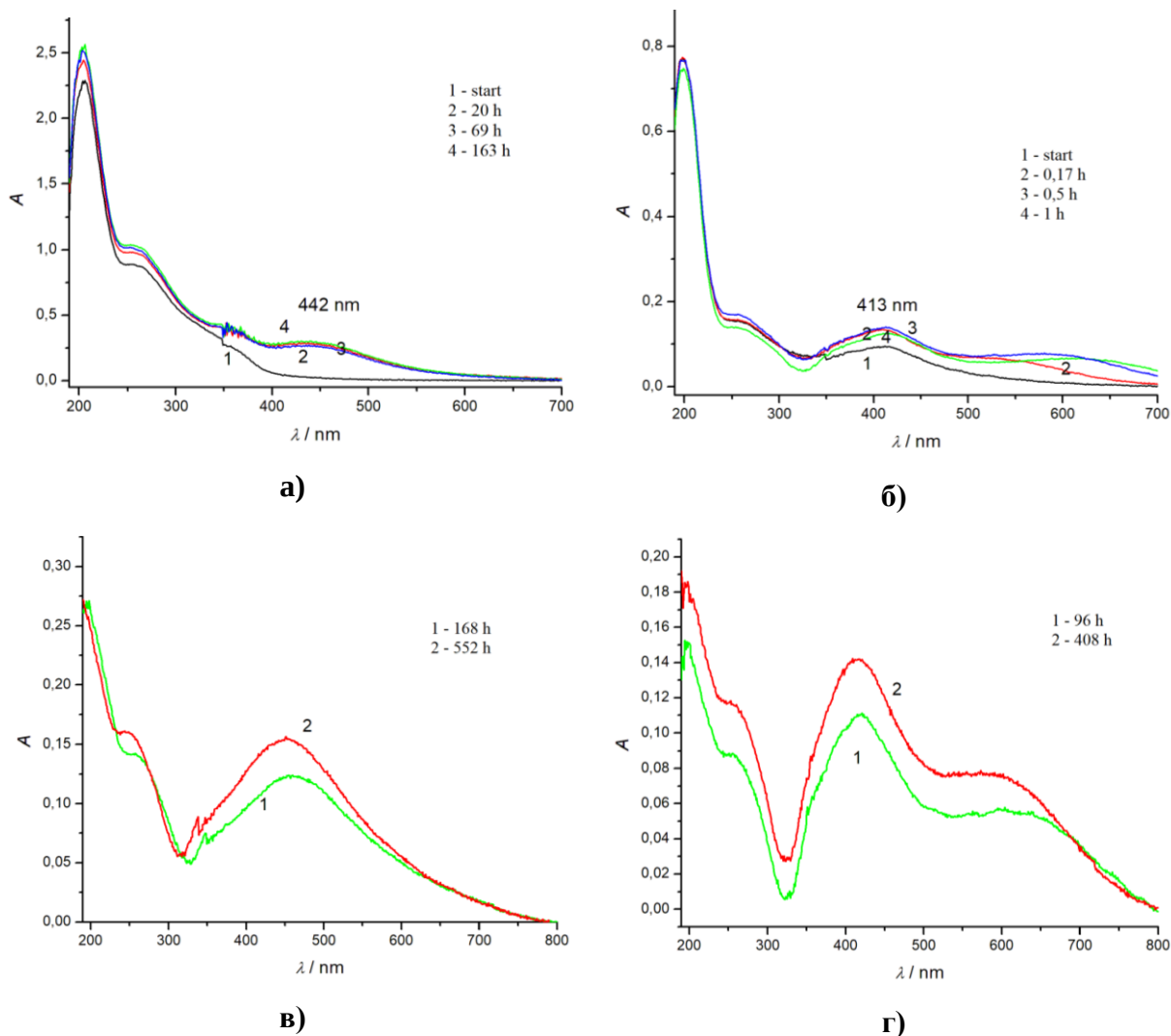




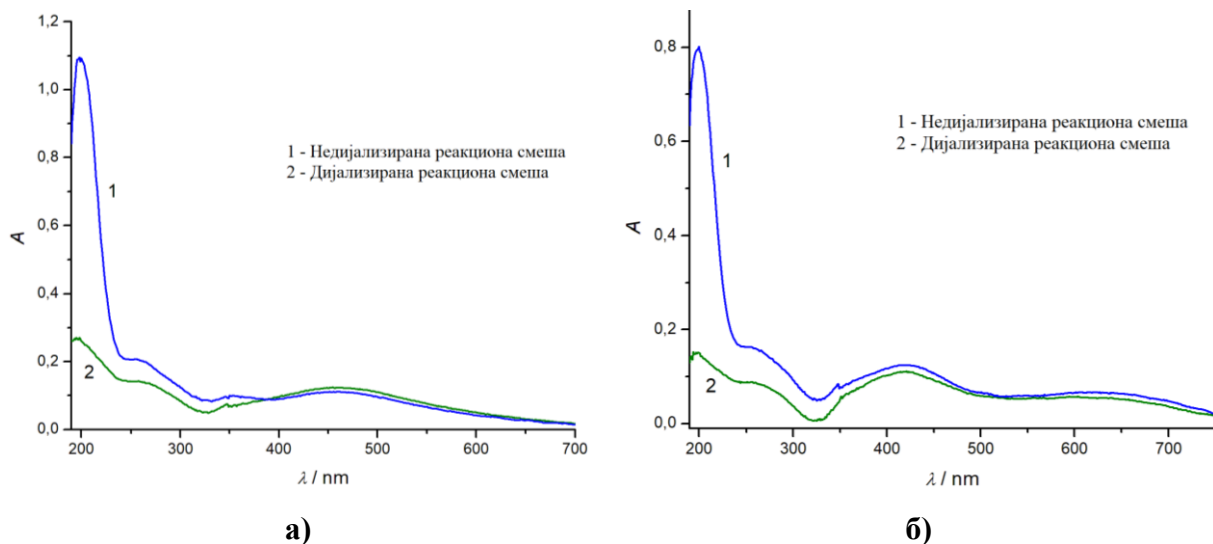
Слика 14. Синтеза и провера стабилности AgNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри екстракта из листа малине добијеног мацерацијом на собној температури и AgNPs-E синтетисаних на собној температури **а)** и температури кључања **б)**; провера стабилности AgNPs-E синтетисаних на собној температури **в)**, температури кључања **г)**



Слика 15. Ефекат дијализе: UV-Vis спектри дијализираних и недијализираних AgNPs-E синтетисаних на собној температури **а)** и температури кључања **б)**. AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта добијеног мацерацијом на собној температури из листа малине

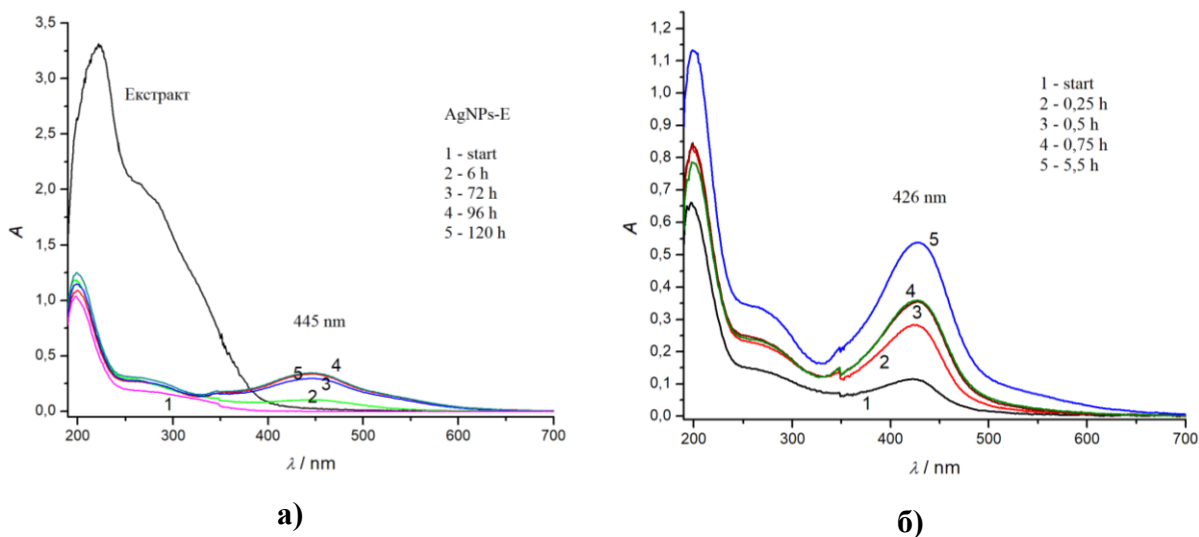


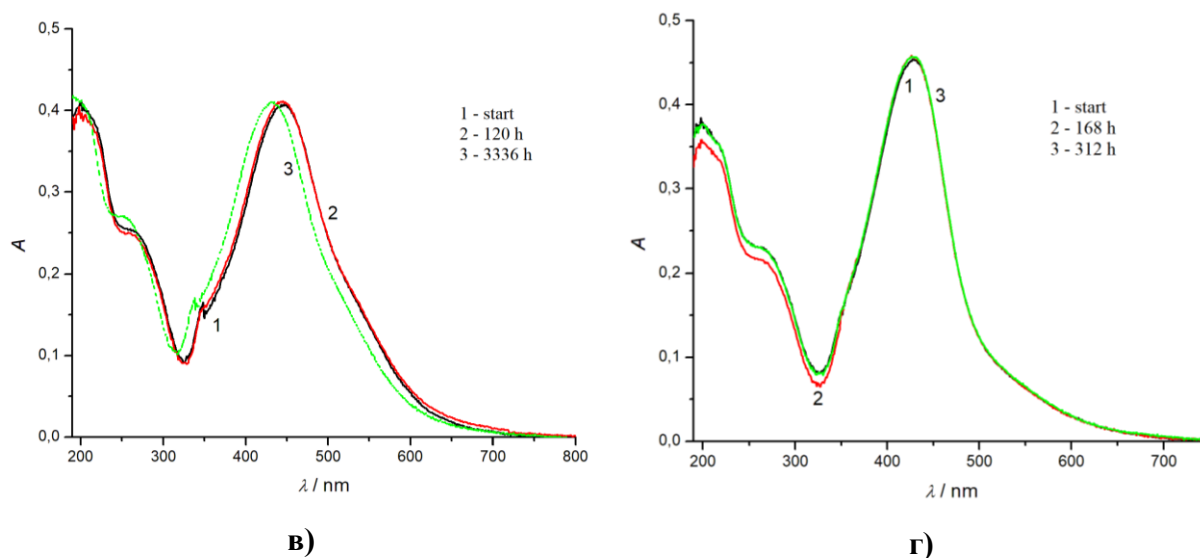
Слика 16. Синтеза и провера стабилности AgNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри екстракта из листа малине добијеног екстракцијом уз рефлукс на ТК и AgNPs-E синтетисаних на собној температури **а)** и температури кључања **б)**; провера стабилности AgNPs-E синтетисаних на собној температури **в)** и температури кључања **г)**



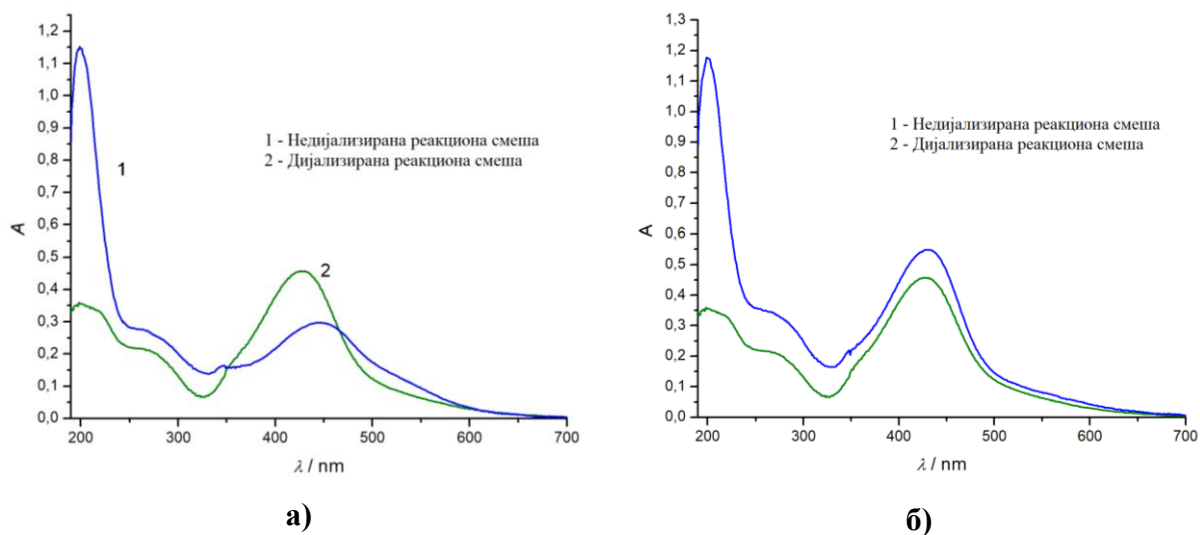
Слика 17. Ефекат дијализе: UV-Vis спектри дијализираних и недијализираних AgNPs-E синтетисаних на собној температури (а) и температури кључања (б). AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта добијеног рефлукс екстракцијом на температури кључања из листа малине

Електронски апсорпциони спектри AgNPs-E синтетисаних екстрактом из листа купине приказани су на сликама 18 – 21.

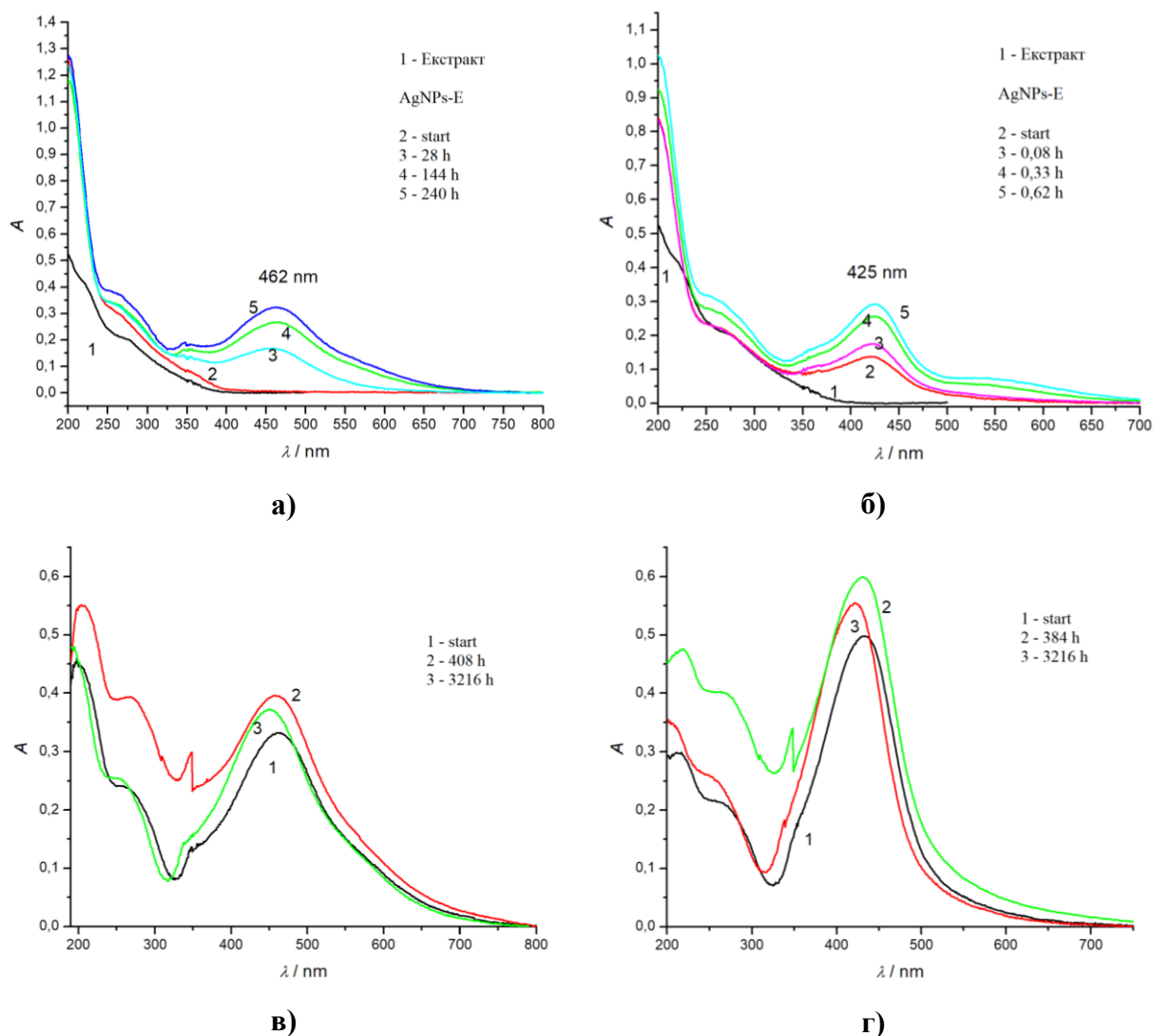




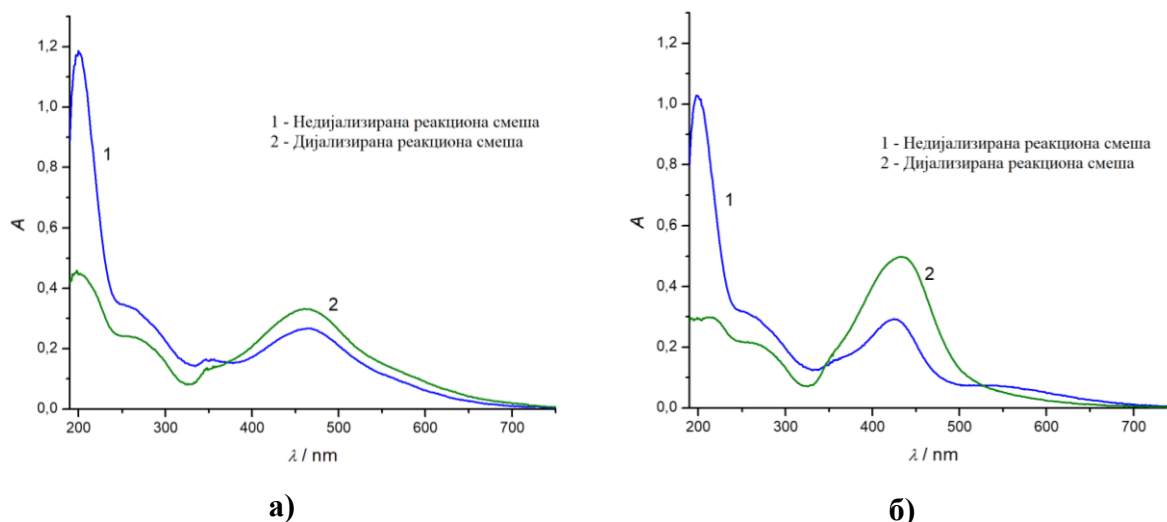
Слика 18. Синтеза и провера стабилности синтетисаних AgNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри екстракта из листа купине добијеног мацерацијом на собној температури и AgNPs-E синтетисаних на собној температури **а)** и температури кључања **б)**; провера стабилности AgNPs-E синтетисаних на собној температури **в)**, температури кључања **г)**



Слика 19. Ефекат дијализе: UV-Vis спектри дијализираних и недијализираних AgNPs-E синтетисаних на собној температури **а)** и температури кључања **б)**. AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта добијеног мацерацијом на собној температури из листа купине



Слика 20. Синтеза и провера стабилности синтетисаних AgNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри екстракта из листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс на температури кључања и AgNPs-E синтетисаних на собној температури **а)** и температури кључања **б)**; провера стабилности AgNPs-E синтетисаних на собној температури **в)** и температури кључања **г)**



Слика 21. Ефекат дијализе: UV-Vis спектри дијализираних и недијализираних AgNPs-E синтетисаних на собној температури (**а**) и температури кључања (**б**). AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта добијеног рефлукс екстракцијом на температури кључања из листа купине

На приказаним електронским апсорпционим спектрима може се уочити појава траке површинске плазмонске резонанце (SPR) на ~ 420 nm код AgNPs-E синтетисаних употребом екстракта купине и малине, и на ~ 440 nm употребом екстракта јагоде (Stevanović et al., 2019; Stevanović et al., 2021). Формирање SPR траке у опсегу 380 – 500 nm представља доказ формирања AgNPs-E редукцијом Ag^+ јона (Bednar, 2014; Mubarak et al., 2011; Huang et al., 2007; Amooaghaie et al., 2015; Sabri et al., 2016). На основу изгледа спектра приказаних на сликама **12(а и б)** може се закључити да се формирање AgNPs-E употребом екстракта јагоде завршава за око 144 h од почетка реакције на собној температури (**12а**) и за око 1,5 h код синтезе на температури кључања (**12б**). Заправо, на температури кључања, са продужењем времена синтезе на 3 h долази до опадања апсорпционог пика, што указује на нижу концентрацију AgNP, што је највероватније последица агрегације која је фаворизована на вишим температурама (Habibullah et al., 2022). Треба нагласити да су за даља истраживања увек коришћене наночестице узимане након оптималних периода синтезе. Спектри приказани на горњим сликама управо илуструју изузетну апликативност UV-Vis спектрофотометрије у праћењу и оптимизацији процеса синтезе AgNPs-E захваљујући осетљивости и значајног интензитета SPR траке формираних наночестица. Исто запажање важи и за наночестице злата чија ће синтеза бити илустрована и дискутована у даљем тексту, без поновног освртања на прикладност и апликативност методе у праћењу тока синтезе и провери стабилности формираних наночестица.



Формирање AgNPs-E употребом екстракта малине завршава се за око 72 h и 22,5 h од почетка реакције на собној температури и температури кључања, респективно, коришћењем екстракта листа малине добијеног мацерацијом (сл. **14a** и **б**); синтеза честица се завршава за око 163 h и 0,5 h на собној температури и температури кључања, респективно, коришћењем екстракта листа малине добијеног екстракцијом уз рефлукс (сл. **16a** и **б**). Формирање AgNPs-E употребом екстракта листа купине завршава се за око 96 h и 5,5 h на собној температури и температури кључања, респективно, коришћењем екстракта добијеног мацерацијом (сл. **18a** и **б**), и за око 240 h и 0,62 h на собној температури и температури кључања, респективно, коришћењем екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс (сл. **20a** и **б**). Недвосмислено је показано да синтеза наночестица иде далеко већом брзином на температури кључања, што је потпуно очекивано имајући у виду кинетичку енергију и ефикасност судара честица на овако високим температурама синтезе. Међутим, морфолошке карактеристике и особине синтетисаних наночестица не зависе само од брзине њиховог формирања (Stevanović et al., 2019; Verma and Mehata, 2016; Abbas et al., 2024; Zhang et al., 2020) тако да је карактеризација и провера активности рађена са већином синтетисаних наночестица.

Нитрати се уклањају из реакционих смеша дијализом уз коришћење врећице за дијализу. UV-Vis спектри недијализираних и дијализираних AgNPs-E суспензија приказани су на сликама **13**, **15**, **17**, **19** и **21**. Процес дијализе је праћен преко смањења интензитета нитратне траке на ~ 270 nm, што представља јасан доказ да се нитрати уклањају дијализом из AgNPs-E суспензија (Stevanović et al., 2019). Треба нагласити да AgNPs-E задржавају своје карактеристике у високој мери након дијализе што је очигледно на основу чињенице да спектар практично остаје непромењен у области SPR траке након дијализе (Stevanović et al., 2021).

Величину синтетисаних AgNPs-E могуће је предвидети према положају SPR траке, пошто је положај траке (400 – 480 nm) директно пропорционалан величини честица (1 – 80 nm), док је интензитет траке директно пропорционалан броју формираних честица (Bednar, 2014). Како повећање пречника наночестица са 10 на 100 nm доводи до померања максимума апсорпције са 400 на 500 nm (Bednar, 2014), могуће је претпоставити да су синтетисане честице пречника око 20 – 30 nm (сл. **12**). Предвиђање величине наночестица додатно је поткрепљено већ објављеним резултатима у којима су AgNP синтетисане и стабилизоване воденим екстрактом из *Fumaria officinalis* истим поступком, где је величина наночестица одређена као 21 ± 1 nm (синтетисане на собној температури) и 18 ± 1 nm (синтетисане на температури кључања) XRD и SEM методама



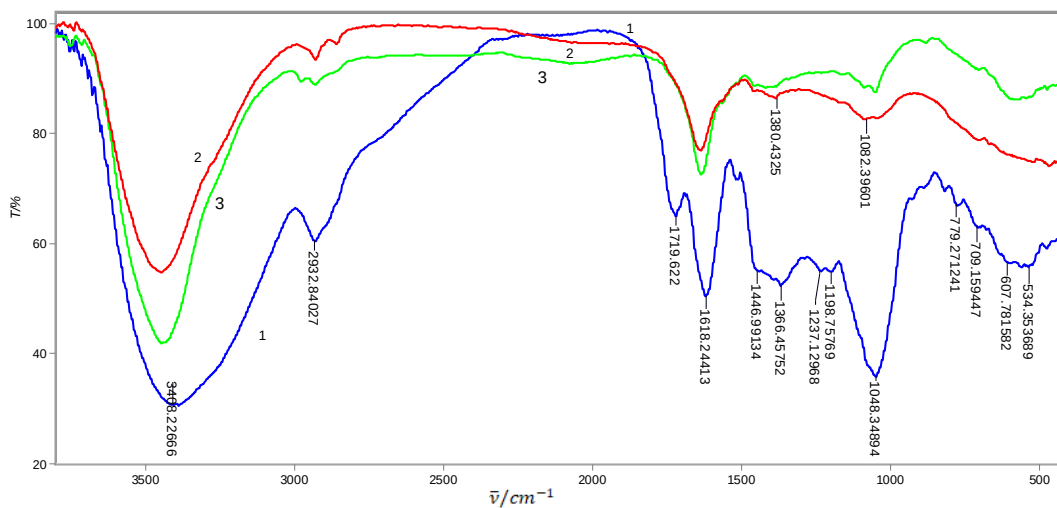
(Cakić et al., 2018). Синтеза и стабилизација AgNP фитохемикалијама из биљних екстраката праћена је помоћу SPR траке и од стране других аутора (Mubarak et al., 2011; Amooghaie et al., 2015) који су дошли до сличних закључака о повезаности величине формираних наночестица и положаја SPR траке. UV-Vis спектри AgNPs-E синтетисаних на собној температури (СТ) и температури кључања (ТК) из екстракта купине добијеног мацерацијом (КМ) и екстракцијом уз рефлукс (КР) (КМ СТ, КМ ТК, КР СТ, КР ТК) приказани су на сликама **18** и **20**. Може се приметити да се величине синтетисаних наночестица значајно разликују на основу положаја SPR траке. Максимуми SPR трака за КМ СТ и КР ТК били су на ~445 и ~426 nm, што указује на величину честица од ~43 и ~27 nm, респективно. Максимуми SPR опсега нису померени током складиштења на собној температури, у мраку, што указује на високу стабилност честица и изостанак агрегације. UV-Vis спектри AgNPs-E синтетисаних на собној температури и температури кључања, екстрактом из листа малине, добијених мацерацијом (ММ) и екстракцијом уз рефлукс (МР) (ММ СТ, ММ ТК, МР СТ, МР ТК) приказани су на сликама **14** и **16**. Максимуми SPR трака за ММ ТК и МР СТ су на ~418 и ~442 nm, што указује на потенцијалну величину честица од ~18 и ~42 nm, респективно. Добијени резултати недвосмислено указују да синтеза при температури кључања доводи до формирања AgNPs-E мањих величина (27 и 18 nm за КР ТК и ММ ТК, респективно) у поређењу са наночестицама синтетисаним на собној температури (43 и 42 nm за КМ СТ и МР СТ, респективно). Као што је примећено раније, са продуженим временом синтезе на температури кључања долази до опадања интензитета SPR траке што указује на нижу концентрацију синтетисаних честица, највероватније због агрегације која се одвија на вишим температурама и дужим временима синтезе (Habibullah et al., 2022). Формиране AgNPs-E су показале високу стабилност будући да максимуми SPR трака нису померени током складиштења на собној температури, у мраку. Конфигурација саме SPR траке је такође релевантна поред њеног положаја (максимума). AgNPs-E стабилизоване биљним екстрактима окарактерисане су као уједначене, сферичне, што је закључено на основу релативно уске и симетричне SPR траке (Velgosova et al., 2018), будући да ширина и интензитет SPR траке зависе од величине и облика формираних наночестица; трака мање ширине и јачег интензитета указује на високу униформност формираних наночестица (Espenti et al., 2016). Трака КМ СТ наночестица на слици **18a** је шира, са благо назначеним раменом на већим таласним дужинама, што сугерише нижу униформност формираних наночестица, па чак и несферичан облик у извесној мери (García, 2011). Овај ефекат је



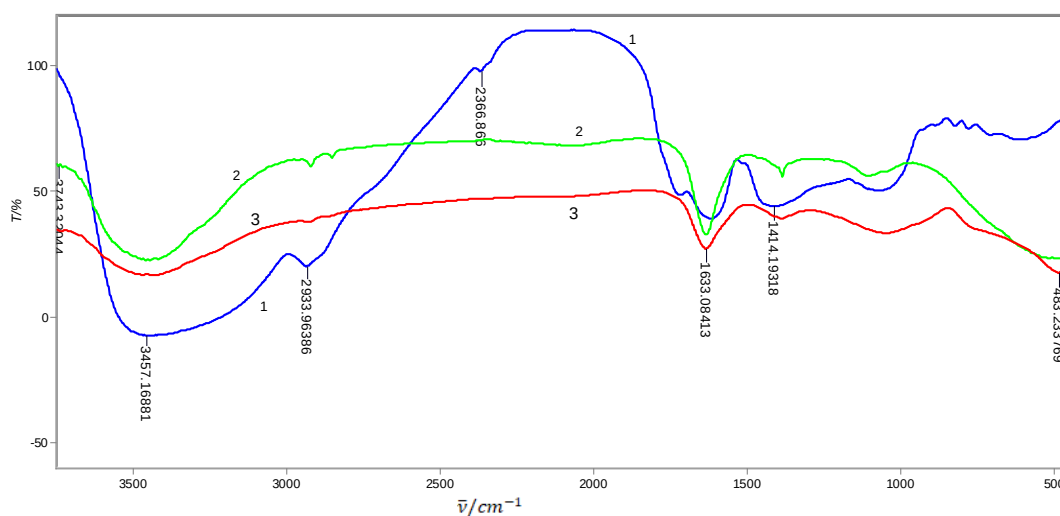
посебно уочљив код МР ТК наночестица (сл. 16г), док су AgNPs-E у МР СТ суспензији (сл. 16а) хомогенијег облика са правилнијом дистрибуцијом величине, као и оне код КМ ТК (сл. 18г). На основу свега наведеног јасно је да се не може извући конзистентан закључак о утицају услова синтезе и врсте екстракта на финални облик наночестица. Расподела величина и облик синтетисаних наночестица су проверени помоћу других техника како је описано у даљем тексту. Коначно, UV-Vis спектри представљени на сликама 12в, 14в и 18г потврдили су релативно високу стабилност формираних AgNPs-E током дужег временског периода на собној температури у мраку. Такође, може се приметити да екстракт купине (сл. 18 – 21) даје равномерније AgNPs-E, са релативно уском дистрибуцијом величине у поређењу са екстрактом малине (сл. 14 – 17) што је узето у обзир приликом селекције честица за даља истраживања.

4.1.2 FT-IR спектрофотометрија екстракта и наночестица сребра

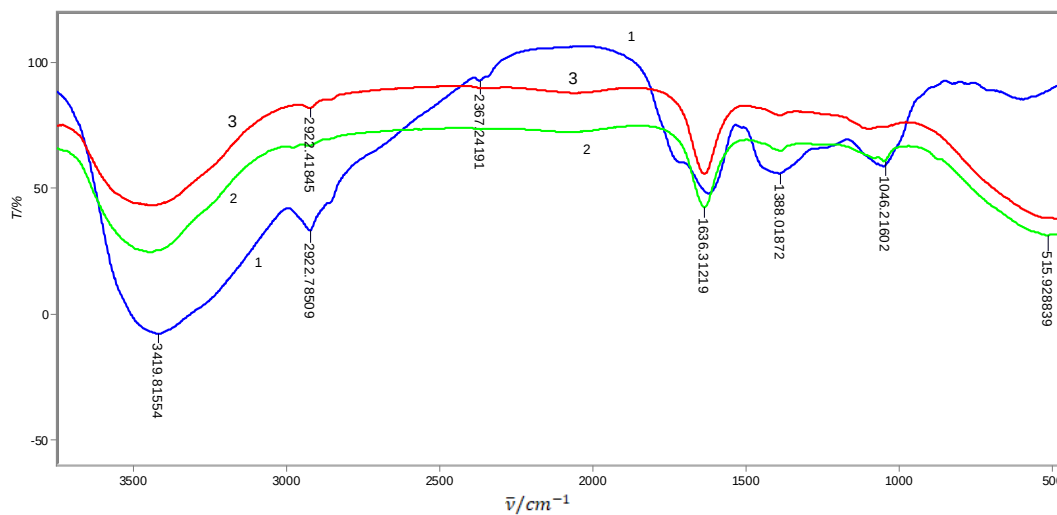
Инфрацрвени спектри екстракта јагоде, и AgNPs-E добијених синтезом на собној температури и температури кључања употребом овог екстракта, приказани су на слици 22 (Stevanović et al., 2021), док су FT-IR спектри AgNPs-E синтетисаних из екстракта малине и купине, као и спектри чистих екстракта, приказани на сликама 23 – 26, респективно (Stevanović et al., 2019). Да би се избегла висока концентрација слободних нитрата у системима снимане су дијализиране суспензије AgNPs-E. Инфрацрвени спектри екстракта малине добијеног мацерацијом, и AgNPs-E синтетисаних на собној температури и температури кључања употребом овог екстракта, приказани су на слици 23; спектри екстракта малине добијеног екстракцијом уз рефлукс, и AgNPs-E синтетисаних на собној температури и температури кључања употребом овог екстракта, приказани су на слици 24. Спектри екстракта купине добијених мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс, и AgNPs-E синтетисаних на собној температури и температури кључања употребом ових екстракта, приказани су на сликама 25 и 26, респективно.



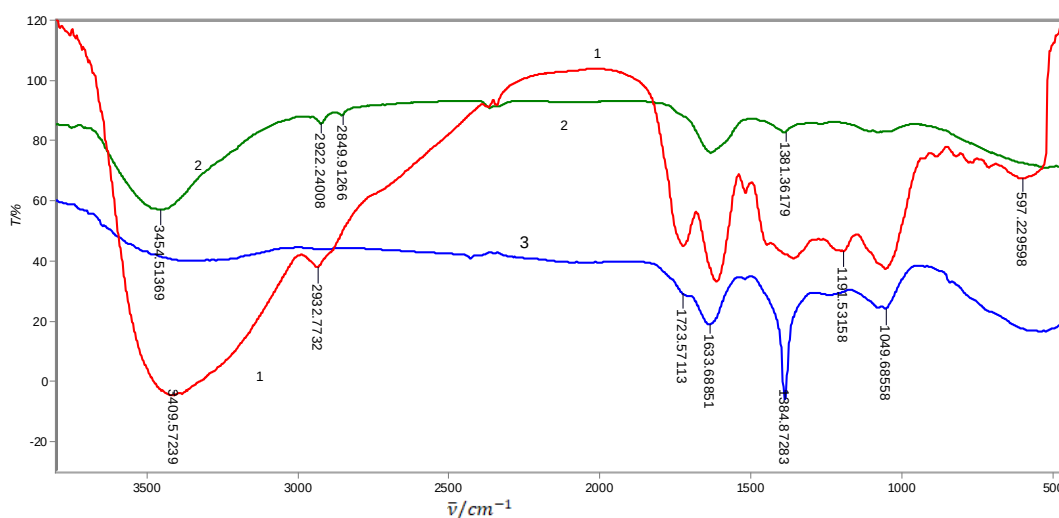
Слика 22. FT-IR спектар воденог екстракта листа јагоде (1) и AgNPs-E синтетисаних и стабилованих овим екстрактом на температури кључања (2) и собној температури (3)



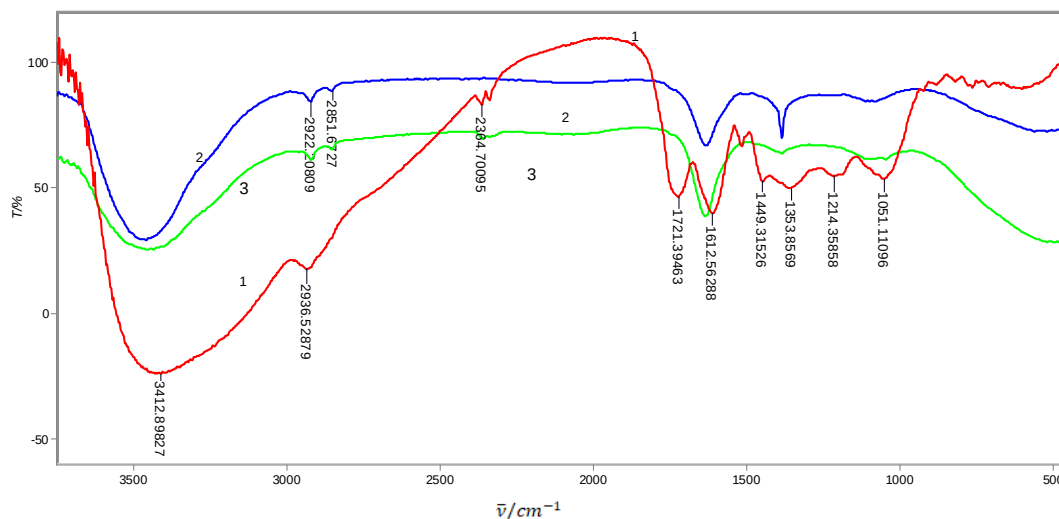
Слика 23. FT-IR спектар воденог екстракта листа малине добијеног мацерацијом (1) и AgNPs-E синтетисаних и стабилованих овим екстрактом на собној температури (2) и температури кључања (3)



Слика 24. FT-IR спектар воденог екстракта листа малине добијеног екстракцијом уз рефлукс (1) и AgNPs-E синтетисаних и стабилованих овим екстрактом на собној температури (2) и температури кључања (3)



Слика 25. FT-IR спектар воденог екстракта листа купине добијеног мацерацијом (1) и AgNPs-E синтетисаних и стабилованих овим екстрактом на собној температури (2) и температури кључања (3)



Слика 26. FT-IR спектар воденог екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (1) и AgNPs-E синтетисаних и стабилованих овим екстрактом на собној температури (2) и температури кључања (3)

Функционалне групе биомолекула укључене у редукцију јона сребра истовремено учествују у спречавању агрегације и стабилизацији наночестица, а могу се индиковати анализом FT-IR спектра екстракта и синтетисаних AgNPs-E (Sakić et al., 2018; Ebrahiminezhad et al., 2012; Kumar et al., 2010). Упоредни приказ FT-IR спектра воденог екстракта листе јагоде и AgNPs-E синтетисаних при температури кључања и собној температури приказан је на слици 22 (Stevanović et al., 2021). Траке у опсегу $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ у спектру екстракта (сл. 22(1)) потичу од валентних ν_{OH} (алкохоли и феноли) и/или ν_{NH} вибрација (амини, амиди, пептиди и протеини). Траке у опсегу од 2920 cm^{-1} и 2850 cm^{-1} потичу од ν_{CH} вибрација. Траке око 1620 cm^{-1} и 1530 cm^{-1} могу се приписати $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$ вибрацијама (Амид I и II, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ и $\delta_{\text{N-H}}$, респективно). Трака на 1713 cm^{-1} потиче од $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ вибрације полифенола. Вибрације функционалних група, које садрже кисеоник или азот (NH , $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$, CNO , $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и OH) се очекују око 1240 cm^{-1} (Kathiravan et al., 2014; Allafchian et al., 2016; Jemilugba et al., 2019; Stevanović et al., 2021). Ове функционалне групе могу да учествују у редукцији сребра и стабилизацији формираних AgNPs-E. Функционалне групе полифенола, протеина, гликозида, алкохола, терпеноида, полисахарида, полиола итд. су идентификоване као потенцијални редукциони и стабилизациони структурни мотиви наведених молекула (Bednar, 2014; Ebrahiminezhad et al., 2017). Ове групе апсорбују у области $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$, $\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$ и $\nu_{\text{C}-\text{N}}$ вибрације). Траке око 770 cm^{-1} потичу од деформационих вибрација $\text{C}-\text{H}$ група ван равни, што указује на присуство полифенола (Ivanov et al.,



2014; Kumar and Yadov, 2009). Упоређивањем FT-IR спектра екстракта са спектрима синтетисаних AgNPs-E (сл. 22) може се приметити значајно смањење интензитета трака у спектрима наночестица. Ово смањење се посебно примећује у области деформационих вибрација $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ и $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$ (δ_{OH}). Долази до благог померања максимума на 1620 cm^{-1} ка нижим таласним бројевима, и потпуног нестанка траке на 1713 cm^{-1} . Поред тога, значајно смањење интензитета трака у области $1000 - 1350\text{ cm}^{-1}$ сугерише да у редукцији Ag^+ јона и стабилизацији формираних наночестица учествују молекули који садрже функционалне групе са кисеоником и азотом (NH , $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$, CNO , $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и OH).

Спектри екстракта купине (сл. 25 и 26) (Stevanović et al., 2019) су слични спектрима екстракта јагоде (сл. 22) и у њима постоји већи број дефинисаних трака у поређењу са спектрима екстракта малине (сл. 23 и 24). Релативно велики број широких комплексних трака указује на веома сложену структуру екстракта. Као што је речено, траке у области $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ потичу од ν_{OH} вибрација и/или ν_{NH} вибрација. Валентне вибрације CH_2 група (ν_{CH}) су на 2936 cm^{-1} (сл. 25) и 2922 cm^{-1} (сл. 24); траке на 1723 cm^{-1} и 1633 cm^{-1} (сл. 25) и 1724 cm^{-1} и 1618 cm^{-1} (сл. 24) могу се доделити $\nu_{(\text{NH})\text{C}=\text{O}}$ и $\delta_{\text{N}-\text{H}}$ вибрацијама, респективно, и/или $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ и $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ полифенола и органских киселина. Широке траке са максимумима на око 1353 cm^{-1} (сл. 25) и 1388 cm^{-1} (сл. 24), са раменом на страни више фреквенције, вероватно потичу од алкохолних вибрација (δ_{CH} и/или δ_{OH}). Пошто је присуство полифенола, органских киселина, гликозида, алкохола итд., доказано LC-MS анализом (Stevanović et al., 2019), траке у области $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ вероватно потичу од $\nu_{\text{C}-\text{O}}$, $\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$ и $\nu_{\text{C}-\text{N}}$ вибрација (Sakić et al., 2018; Amooaghaie et al., 2015; Sathishkumar et al., 2009; Bar et al., 2009).

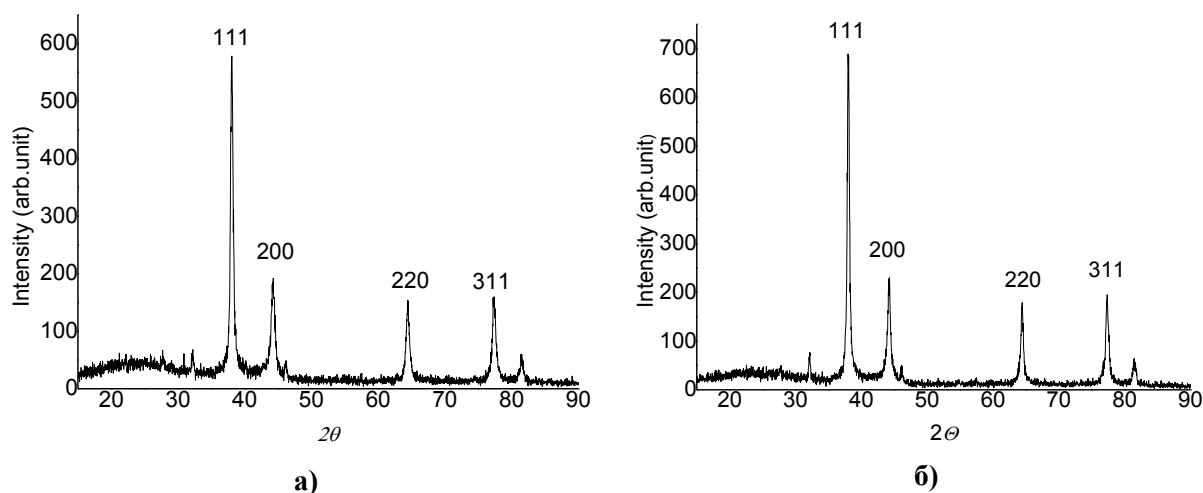
Спектри синтетисаних AgNPs-E (сл. 23–26) се и у овим случајевима значајно разликују од спектра екстракта, у погледу евидентног смањења интензитета или потпуног нестанка упоредивих трака. Интензитет свих наведених трака је смањен након редукције јона сребра. Траке на $\sim 1724\text{ cm}^{-1}$ нестају, док су траке $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$ изгубиле на интензитету и померене су ка већем таласном броју ($\sim 1630\text{ cm}^{-1}$) (сл. 24). Траке на $\sim 1390\text{ cm}^{-1}$, као и траке у области $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ су значајно мањег интензитета и померене су у спектрима AgNPs-E. Добијени резултати потврђују да је редукција Ag^+ јона праћена интеракцијом јона и молекула екстракта током формирања наночестица (Bar et al., 2009; Nikolić et al., 2016). Синтеза и стабилизација AgNPs-E употребом екстракта малине и купине је такође праћена смањењем интензитета трака у области

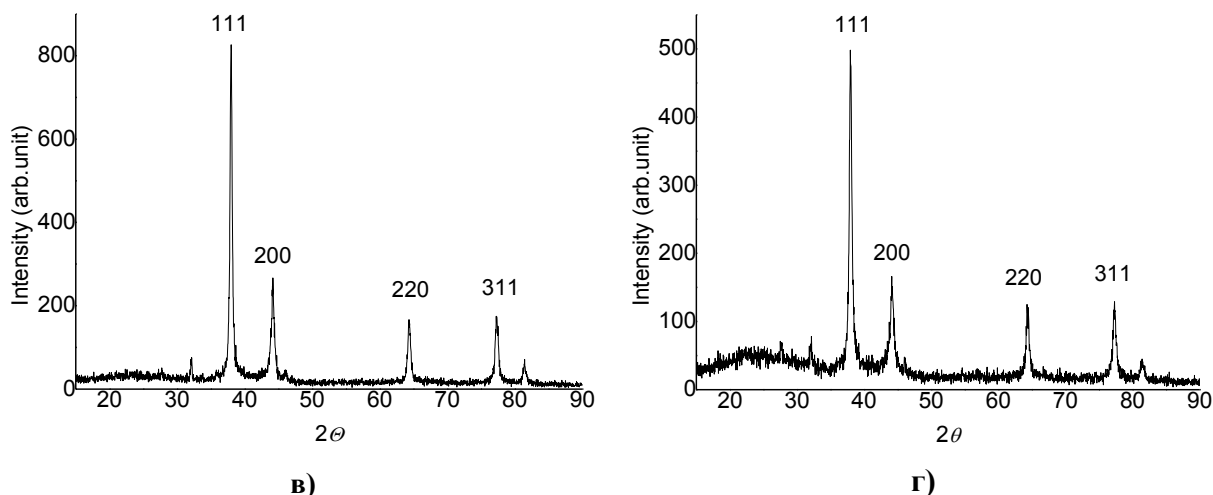


1200 – 1000 cm^{-1} , што сугерише да молекули који садрже функционалне групе са кисеоником и/или азотом играју значајну улогу у стабилизацији AgNPs-E и редукцији Ag^+ јона. Једињења у екстрактима која садрже поменуте функционалне групе су полифеноли, флавоноиди, тритерпеноиди, протеини, органске киселине и полисахариди (Čakić et al., 2016).

4.1.3 XRD анализа наночестица сребра

Наночестице сребра синтетисане употребом воденог екстракта листа купине, добијеног мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, су кристалографски окарактерисане. Селекција екстракта је извршена у складу са горе споменутим критеријумом највеће стабилности синтетисаних наночестица и расположивих ресурса. Кристална структура формираних AgNPs-E је анализирана и дефинисана XRD спектроскопијом (Tasić et al., 2026). Резултати анализе су показали да XRD пикови синтетисаних наночестица са 2θ на око $38,2^\circ$, $44,3^\circ$, $64,5^\circ$, $77,4^\circ$, $81,47^\circ$ (сл. 27) одговарају (111), (200), (220), (311) и (321) равнима рефлексије, респективно, што указује на присуство површински центриране кубне кристалне решетке (*face-centered cubic*, FCC) типичне за елементарно сребро (сл. 1) (Revathi et al., 2024; Hanafiah et al., 2023).





Слика 27. XRD дифрактограми AgNPs-E синтетисаних на собној температури (KM CT) и температури кључања (KM TK), стабилованих коришћењем екстракта листа купине добијеног мацерацијом (а и б, респективно); и AgNPs-E синтетисаних на собној температури (KP CT) и температури кључања (KP TK), стабилованих коришћењем екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс (в и г, респективно)

Раван (111) је најинтензивнија у односу на остале равни (200), (220) и (311) код свих синтетисаних AgNPs-E. Величина синтетисаних AgNPs-E кристалита процењена је коришћењем Брагове рефлексије 2θ за (111), (200) и (220) равни рефлексије, користећи Scherrer-ову једначину (јед. 3) и ширину рефлексије у спектру дифракције X-зрака (Sakić et al. 2019), а добијене вредности дате су у табели 7.

$$D(2\theta) = K\lambda / FW_S \cos\theta \quad \text{јед. 6.}$$

где је D средња величина наночестице (nm), K је Scherrer-ова константа (вредност 0,9 узета као индикативна за сферне честице), λ таласна дужина X-зрака (nm), θ угао дифракције (grad) и FW_S ширење узорка (radian). FW_S је добијен помоћу формуле:

$$FW_S^d = FWHM^d - FW_1^d \quad \text{јед. 7.}$$

где је d параметар деконволуције (вредност 1,5 узета као индикативна за профил који је делимично Gauss-ов, а делимично Lorentz-ов), $FWHM$ је ширина пика на његовој полувисини, и FW_1 је инструментално ширење добијено из LaB₆ дифрактограма на сличним 2θ угловима.



Процењена величина кристалита је дата у табели 7. Просечна величина кристалита испитиваних узорака била је у распону од $18,0 \pm 3$ – $21,1 \pm 2$ nm. Ова величина се поклапа са величинама других синтетисаних AgNPs, стабилованих биљним екстрактима, под сличним условима и утврђених истом методом (Raj et al., 2018; Logeswari et al., 2015). Raj и сарадници (2018) су у свом раду користили водени екстракт листова *Enicostemma axillare* (Lam.) у стабилизацији AgNPs, при чему је измерена просечна величина кристалита између 16 и 31 nm. Слично овоме, Logeswari и сарадници (2015) су за стабилизацију AgNPs применили пет водених екстраката из листова биљака *Ocimum tenuiflorum*, *Solanum tricornatum*, *Syzygium cumini*, *Centella asiatica* и *Citrus sinensis*. Њихови резултати су показали да су синтетисане AgNPs просечне величине кристалита 26 nm, 26 nm, 59 nm, 20 nm и 24 nm коришћеним екстраката из *O. tenuiflorum*, *S. cumini*, *C. sinensis*, *S. tricornatum* и *C. asiatica*, респективно. Изглед спектра (сл. 27) и вредности величине честица (таб. 7) које су приближно исте за све испитиване узорке (KM CT, KM TK, KP CT и KP TK) указују на то да техника екстракције и услови синтезе наночестица не утичу значајно на њихову кристалографску структуру и величину, као и то да формирање и раст наночестица редукцијом Ag^+ јона највише зависи од врсте стабилизационих агенаса.

Табела 7. Величине кристалита синтетисаних AgNPs-E процењене XRD анализом

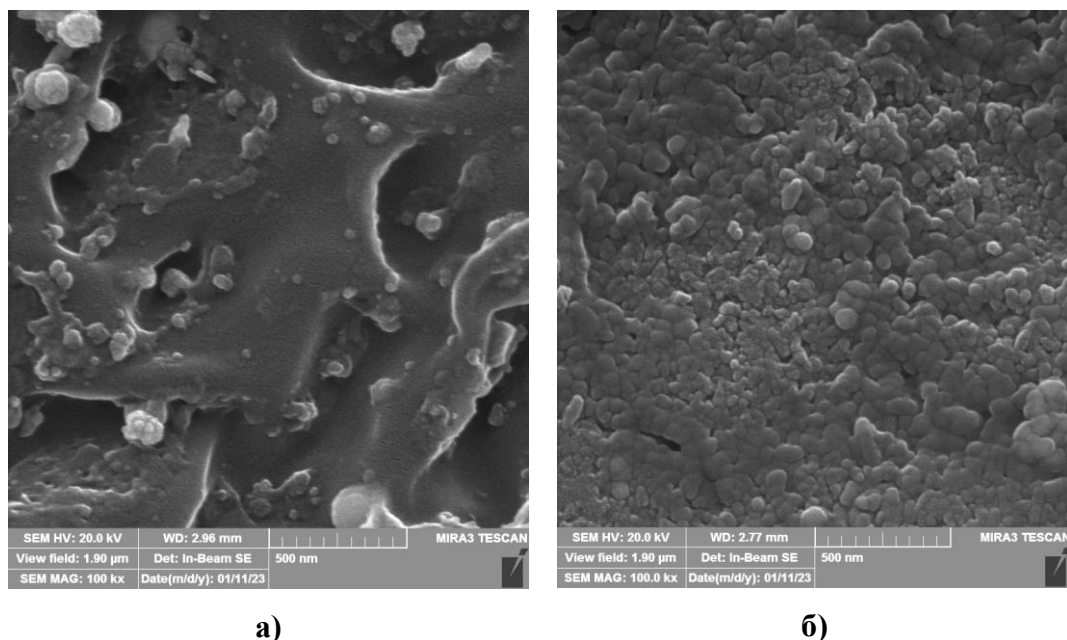
<i>hkl</i>	2θ [deg]	d [Å]	$FWHM$ [deg]	Величина (nm)	
KM CT					XRD
111	38,054	2,365	0,410	20,5	18,0±3
200	44,239	2,047	0,565	15,2	
220	64,431	1,445	0,521	18,1	
KM TK					
111	38,020	2,365	0,42	20,0	21,1±2
200	44,218	2,048	0,41	21,0	
220	64,417	1,445	0,42	22,3	
KP CT					
111	38,001	2,365	0,364	23,1	20,5±3
200	44,184	2,049	0,440	19,5	
220	64,313	1,446	0,497	18,9	
KP TK					
111	37,982	2,367	0,43	19,5	20,0±2
200	44,130	2,050	0,46	18,6	
220	64,475	1,435	0,43	21,8	

Скраћенице су дате у опису слике 27.



4.1.4 SEM анализа наночестица сребра

Карактеризација облика и величине наночестица је веома важна за истраживања и технолошку примену (Singh et al., 2018; Zhou and Tang, 2018) будући да ове особине значајно утичу на својства наночестица. Величина наночестица дефинише површину од које зависе специфичне особине саме честице. Ако је честица мања, однос површине и запремине је већи, а самим тим се повећава и ефикасност честице у испољавању одређених активности (Dipankar and Murugan, 2012). Од ових параметара зависи и каталитичка активност честица. Што се тиче облика наночестица сребра синтетисаних „зеленом“ методом, најчешће су сферне, троугласте и хексагоналне (Ying et al., 2022). Морфологија површине AgNPs-E синтетисаних у овом раду одређена је скенирајућом електронском микроскопијом (SEM), а одабране микрографије приказане су на слици 28 (Tasić et al., 2026). Микрографије су снимљене за узорке који су, на основу UV-Vis спектроскопске анализе, показали највећу стабилност током времена. Ови узорци су одабрани као репрезентативни за морфолошку карактеризацију наночестица.



Слика 28. SEM микрофотографије AgNPs-E синтетисаних на собној температури и стабилованих помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури (KM CT) (а), и AgNPs-E синтетисаних на температури кључања и стабилованих помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (KP TK) (б)

SEM микрографије синтетисаних AgNPs-E указују на то да су наночестице претежно сферног облика, иако је уочен и мањи број са кубичном морфологијом. Током процеса

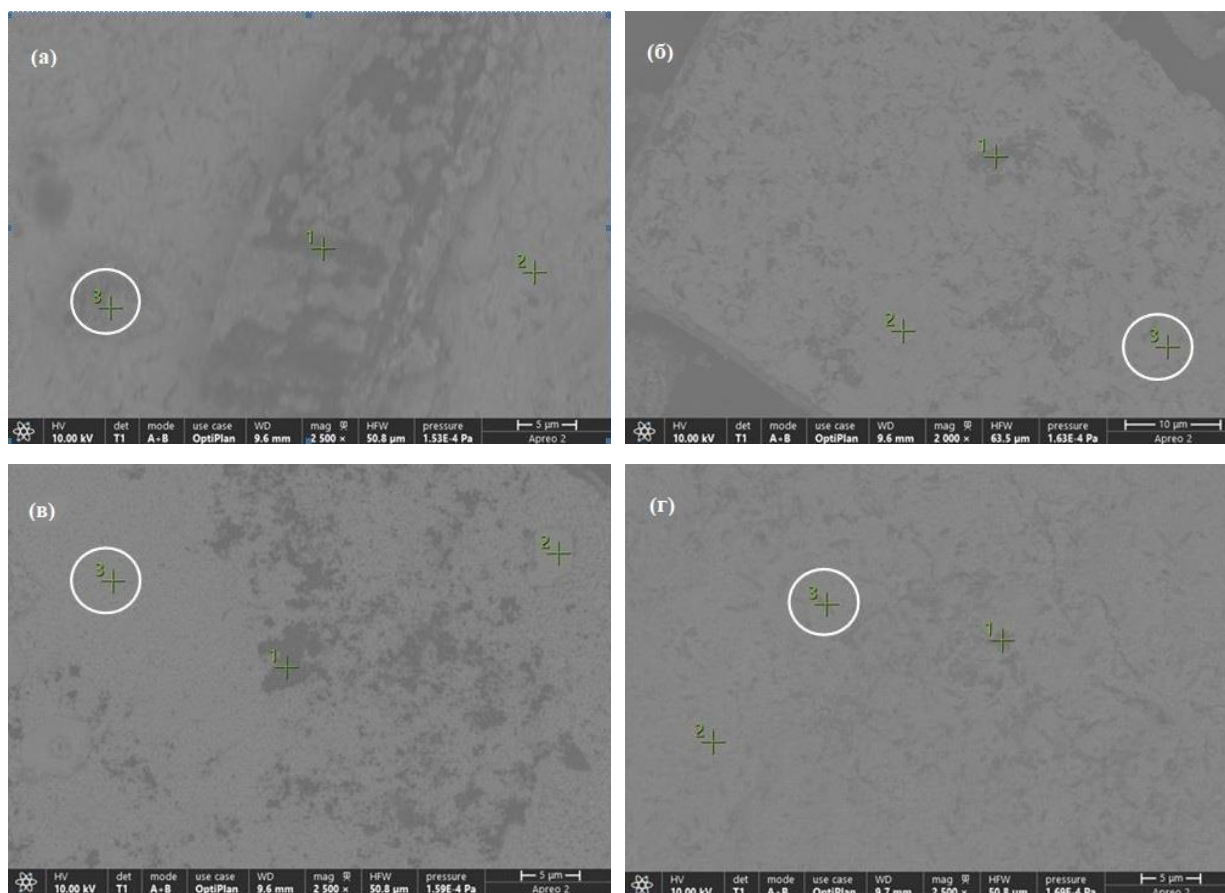


зелене синтезе, облик наночестица је остао уједначен, што указује на контролисане услове реакције. Ови резултати су у складу са истраживањима других аутора који су такође приметили формирање претежно сферичних наночестица приликом употребе биљних екстраката (Al Baloushi et al., 2024; Ajitha et al., 2016). У исто време, утврђено је да на облик наночестица сребра не утиче значајно концентрација биљног екстракта који се користи за редукцију и стабилизацију, што додатно потврђује њихову морфолошку стабилност (Ajitha et al., 2015; Ahmed et al., 2016; Asif et al., 2022). Показано је да на облик синтетисаних наночестица сребра не утиче начин припреме биљног материјала (осушен или свеж; степен уситњености, итд.); врста биљног материјала (лист, корен, стабљика, кора, семе, цвет), врста екстракта (водени; етанолни; метанолни). Al Baloushi и сарадници (2024) су за добијање воденог екстракта користили свеже листове *Moringa peregrina*, при сличним условима синтезе, при чему су формиране наночестице биле сферног облика. Asif и сарадници (2022) су користили прах добијен из опраних и осушених листова биљке *M. oleifera* за добијање воденог екстракта; синтеза је вршена при условима сличним као у овом раду, са различитим концентрацијама екстракта, и као резултат су добили сферне наночестице. Asefian и Ghavam (2024) су користили целе биљке *A. wilhelmsii*, *C. longa* и *M. chamomilla* за добијање водених екстраката, синтезу вршили при условима различитим у односу на услове у овом раду (различита концентрација раствора AgNO_3 , итд.), при чему су још једном добијене претежно сферне наночестице. До сферне морфологије наночестица сребра доводи и синтеза при различитим концентрацијама раствора AgNO_3 (3, 5, 10, 15 mM), уз употребу метанолног екстракта биљке *Medicago sativa* за стабилизацију наночестица. Луковице црног и белог лука коришћене за припрему воденог екстракта и даљу синтезу при сличним условима као у овом раду, такође формирају наночестице претежно сферног облика (Bouqellah et al., 2018). Marslin и сарадници (2015) су окарактерисали синтетисане наночестице стабилизоване воденим екстрактима листова и корена биљке *Withania somnifera*, при различитим концентрацијама, при чему је SEM анализа опет потврдила формирање наночестица сферног облика. Наведени резултати сугеришу да је највећа вероватноћа формирања сферних наночестица сребра када се као извор сребра користи AgNO_3 , а смеша биомолекула из поларних биљних екстраката као редукујући и стабилизациони агенс.

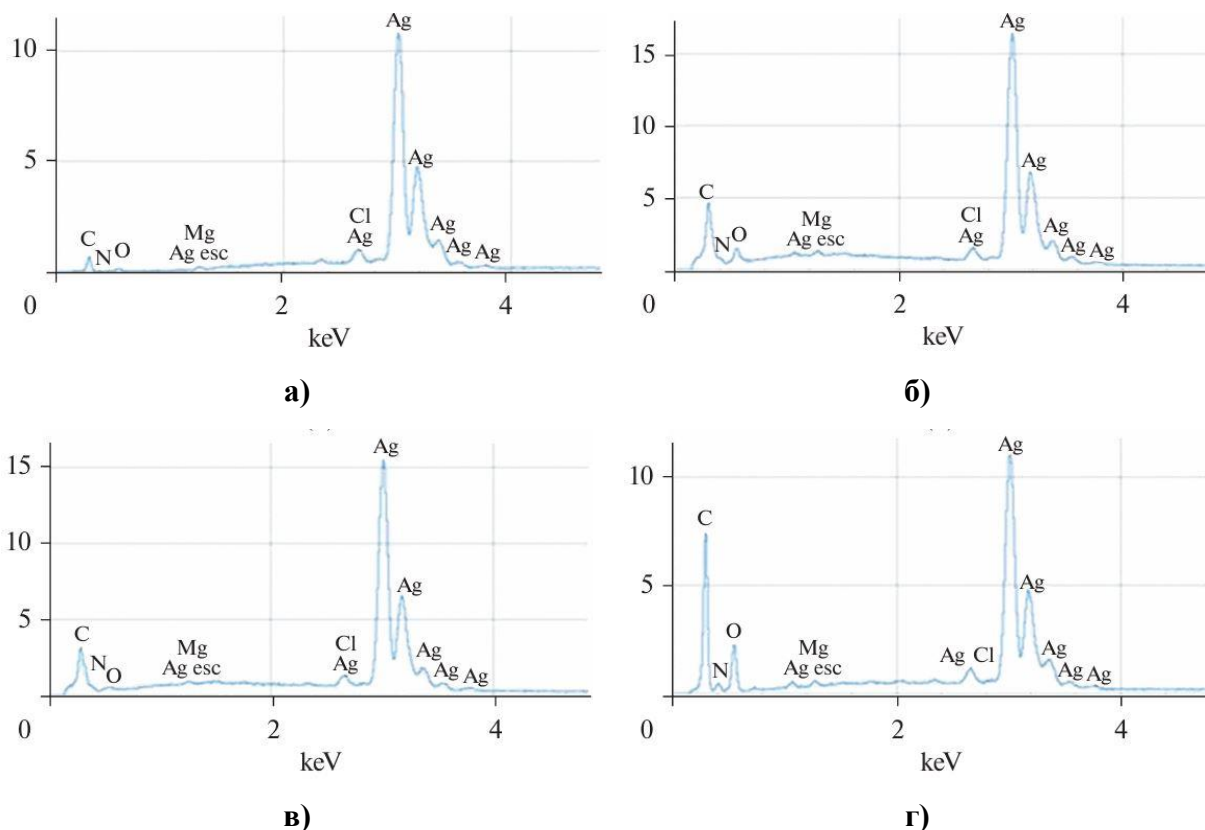


4.1.5 EDX анализа наночестица сребра

Енергијска дисперзиона спектроскопија (EDX) је примењена у циљу квалитативне и квантитативне анализе синтетисаних AgNPs-E. Ова спектроскопија користи спектар X-зрака емитованих са површине узорка у чврстом стању третираног електронима у циљу анализе присутних хемијских елемената. На сликама **29** и **30** су приказане EDS микрографије и EDS спектри испитиваних узорака (Tasić et al., 2026).



Слика 29. EDS микрографије AgNPs-E синтетисаних на собној температури (KM CT) **(а)** и температури кључања (KM TK) **(б)** помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури; и AgNPs-E синтетисаних на собној температури (KP CT) **(в)** и температури кључања (KP TK) **(г)** помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс



Слика 30. EDS спектри AgNPs-E синтетисаних помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури (KM CT) (а) и температури кључања (KM TK) (б); и екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс на собној температури (KP CT) (в) и температури кључања (KP TK) (г)

Присуство пикова на приближно 3 keV потврђује присуство елементарног сребра у суспензији AgNPs-E (сл. 30), што се може приписати површинској плазмонској резонанци (SPR) нанокристалиа сребра. Поред доминантног сигнала који највише одговара елементарном сребру, други сигнали који се јављају мањим интензитетом указују на присуство C и Mg, који највероватније потичу од фитохемијских елемената из екстракта. Ова претпоставка је додатно поткрепљена резултатима ICP-OES (видети поглавље 4.1.5.1) анализе која је показала присуство Mg у екстрактима коришћеним у синтези наночестица.

Атомски и масени удео хемијских елемената у испитиваним узорцима приказан је у табели 8. Највећи проценат елементарног сребра био је у узорку KM CT, а најмањи у узорку KP TK. Ови резултати потврђују да највећу ефикасност показује синтеза наночестица на собној температури, уз употребу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури. Дакле, ефикасност екстрахованих фитохемикалија у улози стабилизационих и редукционих агенаса се показала као већа при блажим



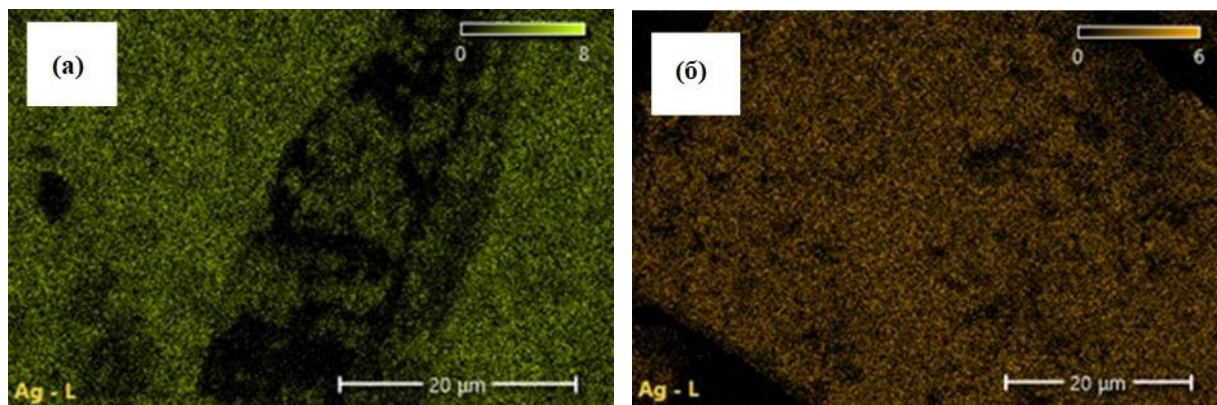
условима екстракције и синтезе наночестица, на основу EDX анализе. Могло би се закључити да блажи услови екстракције и синтезе одговарају споријој, али ефикаснијој, редукцији и синтези наночестица која за последицу има већи проценат редукованог и у честицама „заробљеног“ сребра (Fahim et al., 2024).

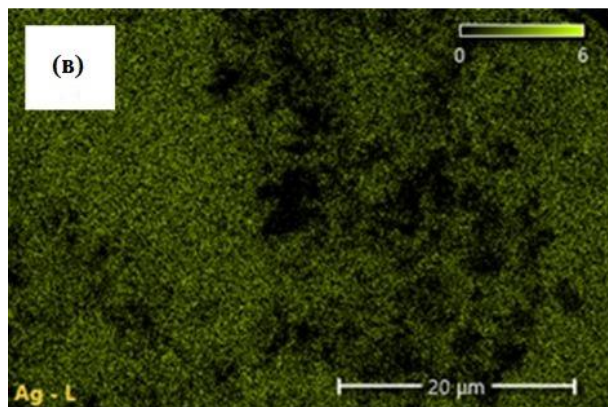
Табела 8. Атомски и масени удео (%) хемијских елемената у суспензијама синтетисаних AgNPs-E

Узорак	Атомски удео, %						Масени удео, %					
	C	N	O	Mg	Cl	Ag	C	N	O	Mg	Cl	Ag
КМ СТ	3,3	0,2	4,0	0,6	2,4	89,6	0,4	0,0	0,7	0,2	0,9	97,9
КМ ТК	7,0	4,2	4,2	0,8	1,1	82,6	0,9	0,6	0,7	0,2	0,4	97,1
КР СТ	4,7	5,8	5,4	0,6	0,4	83,2	0,6	0,9	0,9	0,2	0,1	97,3
КР ТК	18,9	2,0	27,7	0,6	1,5	49,4	3,7	0,4	7,3	0,2	0,9	87,5

Скраћенице су дате у опису слике 30.

Електронски сноп одређене таласне дужине користи се да побуди атоме у AgNPs-E што резултира емисијом рендгенских зрака са енергијом специфичном за тај елемент (SEM/EDX мапирање). SEM/EDX мапирање комбинује слике високе резолуције са површине узорка (SEM) са елементалном анализом (EDX) да формира визуелне мапе које показују дистрибуцију појединих елемената на површини узорка или неког материјала (De Giglio et al., 2013). SEM/EDX зелено мапирање на слици 31(а и в) и жуто мапирање (б) указују на то да су наночестице састављене од елементарног сребра прилично равномерно распоређене у узорку и да су униформне по облику и величини (Ajitha et al., 2015).





Слика 31. Анализа SEM/EDX елементарног мапирања AgNPs-E употребом EDX спектроскопије; расподела елементарног сребра у AgNPs-E синтетисаним на собној температури (KM CT) (**а**) и температури кључања (KM TK) (**б**) помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури; расподела елементарног сребра у AgNPs-E синтетисаним на собној температури (KP CT) (**в**) помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс

4.1.5.1 ICP-OES анализа екстракта

У циљу провере присуства макро- и микроелемената у самим екстрактима малине и купине који су коришћени у синтези и стабилизацији наночестица сребра и злата извршена је ICP-OES анализа екстракта. Екстракти су квантитативно анализирани на 34 елемената: As, Ag, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn, Hg, Si, P, S, Ce, Sn, Ta, Ti, V, W, Ge и Nb. Измерене концентрације елемената у екстрактима применом ове методе приказане су у табели 9.

Табела 9. Концентрације елемената (μgcm^{-3}) у екстрактима малине и купине добијене ICP-OES анализом

Елемент	KM	KP	MM	MP
As	0	0	0	0
Ag	0	0	0	0
B	0,38	2,03	0,42	1,32
Ba	0,22	0,3	0,27	0,6
Bi	0	0	0	0
Ca	22,29	50,46	41,78	68,85
Cd	0	0	0	0
Co	0	0	0	0
Cr	0	0	0,01	0
Cu	0,34	2,05	0,46	0,39
Fe	0	0,54	0	0



In	0	0	0	0
K	276,04	272,22	238,33	350,91
Li	0	0	0	0
Mg	39,18	65,5	32,62	57,32
Mn	9,9	14,64	3,06	5,23
Na	15,18	13,13	14,88	13,63
Ni	0	2,4	0	0
Pb	0	0	0	0
Sr	0	0	0	0
Tl	0	0	0	0
Zn	0,82	1,12	0,83	0,95
Hg	0	0,01	0	0
Si	2,39	3,62	1,34	3,14
P	122,1	239,72	67,98	139,43
S	4,24	12,99	9,35	7,95
Ce	0	0	0	0
Sn	0	0	0	0
Ta	0	0	0	0
Ti	0	0	0	0
V	0	0	0	0
W	0	0	0	0
Ge	0	0	0	0
Nb	0	0	0	0

КМ – екстракт купине добијен мацерацијом

КР – екстракт купине добијен рефлукс екстракцијом

ММ – екстракт малине добијен мацерацијом

МР – екстракт малине добијен рефлукс екстракцијом

Начин екстракције биљних екстраката има пресудан утицај на изолацију макро, микро и токсичних елемената из биљне матрице. Екстракција уз рефлукс, због повишене температуре и интензивног разарања ћелијских структура, доводи до интензивније екстракције. Насупрот томе, мацерација представља благу технику при којој у раствор прелазе претежно слабо везани јони, док већина прелазних и тешких метала остаје везана за биљну матрицу (Mittal et al., 2013; Singh et al., 2018; Rai et al., 2014). Резултати у табели **9** потврђују да је екстракцијом уз рефлукс (екстракти МР и КР) постигнут већи степен изолације минерала у поређењу са поступком мацерације (екстракти ММ и КМ) на собној температури. Од макроелемената, детектовани су Са, К, На, Мг, Р и S (таб. **9**). Макроелементи присутни у биљним екстрактима који се користе у зеленој синтези, могу значајно утицати на процес формирања наночестица сребра (Iravani, 2011; Mittal et al., 2013). Сумпор је најутицајнији елемент са аспекта контроле синтезе AgNPs. У биљним екстрактима присутан је најчешће у облику тиолних (–SH) група из



аминокиселина и протеина, као и у оксидованим облицима сулфата. Тиолне групе имају изразито висок афинитет према сребру и формирају веома стабилне Ag-S везе, што доводи до ограничења раста наночестица (Azad et al., 2023; Ahmed et al., 2016). Фосфор је у биљним екстрактима присутан претежно као фосфатни јон. Фосфати имају способност комплексирања сребрових јона, чиме се смањује концентрација слободних Ag^+ јона доступних за редукцију, што успорава нуклеацију и омогућава контролисан раст наночестица са ужом расподелом величина. Поред тога, фосфати повећавају негативан zeta-потенцијал AgNPs, чиме доприносе њиховој колоидној стабилности (Afshinnia and Baalousha, 2017).

Калијум (K^+) и калцијум (Ca^{2+}) представљају уобичајене макроеlemente биљног порекла и готово су увек присутни у биљним екстрактима који се користе за зелену синтезу наночестица сребра. Иако се ови јони не редукују до металног облика у условима синтезе, они могу значајно утицати на кинетику реакције, колоидну стабилност и коначна физичко-хемијска својства синтетисаних наночестица (Afshinnia and Baalousha, 2017; Igravani, 2011). Калијум је у воденим биљним екстрактима присутан као потпуно хидратисан K^+ јон који се својим редукционим потенцијалом ($\text{K}^+/\text{K}^0 = -2,93 \text{ V}$) не може редуковати у условима зелене синтезе и не учествује директно у формирању металног језгра AgNPs (Atkins and de Paula, 2006), али индиректно утиче на повећање јонске јачине раствора. Повећана јонска јачина доводи до смањења електростатичког одбијања и, при повишеним концентрацијама K^+ јона, до почетне агрегације и смањења колоидне стабилности (Afshinnia and Baalousha, 2017; Kora and Rastogi, 2018). Калцијум има знатно израженији утицај на зелену синтезу наночестица сребра у поређењу са калијумом због свог двовалентног карактера, јер ефикасније неутралише негативно површинско наелектрисање наночестица у односу на једновалентне јоне, чиме значајно смањује вредност zeta-потенцијала и стабилност колоидног система. Присуство калијума, и нарочито калцијума, у биљним екстрактима мора се дакле пажљиво контролисати приликом оптимизације „зелене“ синтезе сребрних наночестица.

Присуство магнезијума (Mg^{2+}) и мангана (Mn^{2+}) у растворима добијеним након биосинтезе наночестица сребра представља честу и очекивану појаву, која такође потиче из природног састава биљних екстраката коришћених за редукцију и стабилизацију честица (Igravani, 2011; Ahmed et al., 2016). Биљни материјали природно садрже значајне количине Mg, који је саставни део молекула хлорофила и кофактор многих ензима, као и Mn, који је присутан у оксидоредукционим ензимима и



полисахаридним структурама ћелијских зидова (Taiz et al., 2017). Током процеса екстракције ови елементи прелазе у течни екстракт и остају присутни у реакционој средини и након формирања наночестица сребра. За разлику од јона сребра, који се под дејством биљних редукционих агенаса (полифенола, флавоноида, аскорбинске киселине) редукују до металног облика Ag^0 , јони Mg^{2+} и Mn^{2+} остају у стабилном јонском облику. То је директна последица њихових стандардних редукционих потенцијала који имају значајне вредности у поређењу са Ag^+ јонима ($\text{Ag}^+/\text{Ag}^0 = +0,80 \text{ V}$; $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^0 = -1,18 \text{ V}$; $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}^0 = -2,37 \text{ V}$), што онемогућава њихову редукцију у условима зелене синтезе (Atkins and de Paula, 2006; Mittal et al., 2013). Због тога Mg и Mn не учествују у формирању металног језгра наночестица сребра, већ остају растворени у течној фази система. За разлику од тешких метала и прелазних елемената попут Cu^{2+} или Fe^{2+} који се могу делимично адсорбовати на површину наночестица или учествовати у секундарним редокс процесима, Mg^{2+} и Mn^{2+} остају хидратисани у раствору и не остварују стабилне метал–метал везе са AgNPs (Rai et al., 2009; Kora and Rastogi, 2018). Присуство јона метала попут гвожђа, бакра и цинка је од изузетног значаја јер може довести до њихове упоредне редукције са Ag^+ јонима, при чему се троше биљни редукциони агенси (полифеноли и флавоноиди), убрзава њихова оксидација и нарушава контрола самог процеса. То може довести до дестабилизације колоидног система и повећања полидисперзности, појаве биметалних наночестица (Ag-Fe и Ag-Cu) или изражене агрегације честица (Iravani, 2011; Mittal et al., 2013; Ahmed et al., 2016; Singh et al., 2018). Изоловани екстракти, изузев КР, нису садржали јоне гвожђа, док су јони бакра детектовани у концентрацијама $0,34 - 2,05 \mu\text{gcm}^{-3}$, што судећи по публикованим студијама нема већи утицај на ток синтезе наночестица (узети у обзир да се екстракт у финалној реакционој смеши своди на мању концентрацију приликом разблажења). Стандардни редукциони потенцијали указују да и Cu^{2+} и Fe^{3+} могу конкурисати Ag^+ у процесу редукције ($\text{Ag}^+/\text{Ag}^0 = +0,80 \text{ V}$; $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = +0,77 \text{ V}$; $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0 = +0,34 \text{ V}$), што доводи до трошења биљних редукционих средстава и смањења ефикасности формирања чистих AgNPs (Atkins and de Paula, 2006).

Одсуство токсичних метала попут олова (Pb^{2+}), кадмијума (Cd^{2+}), живе (Hg^{2+}) и арсена (As^{3+}) (таб. 9) који се могу инкорпорисати у структуру наночестица и значајно повећати њихову токсичност, оправдава планирану примену истих у медицини и козметичи (WHO, 2017). Присуство Hg , Cr и Ni у концентрацијама $0,01$, $0,01$ и $2,4 \mu\text{gcm}^{-3}$, у екстрактима КР, ММ и КР, респективно, може се сматрати безбедним јер биљке природно акумулирају никл из тла, док се Hg и Cr могу појавити у траговима, услед

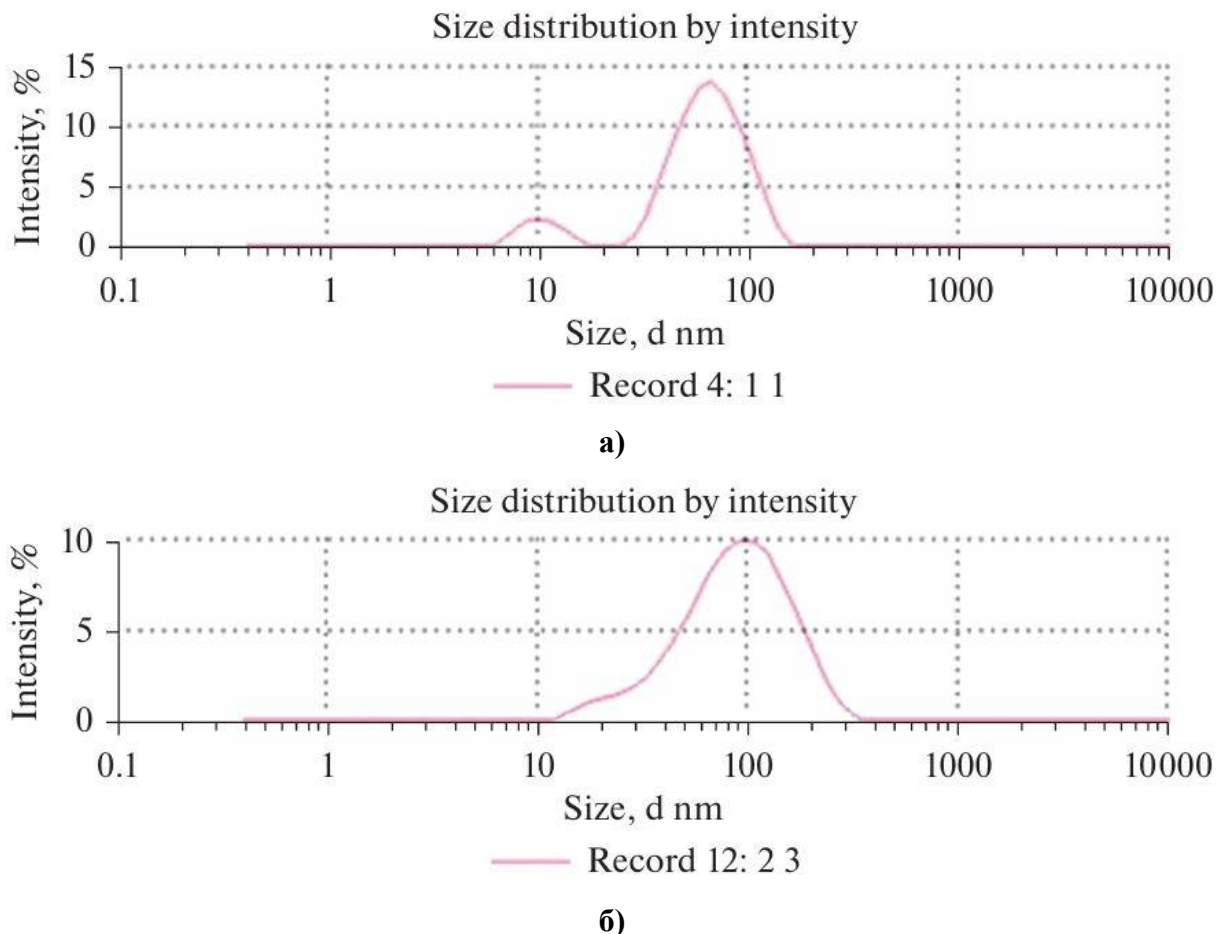


присуства у земљишту (Hassan et al., 2019; Shahzad et al., 2018). Поређењем са екстрактима других биљака (камилица, хајдучка трава, звечарка, мента, невен, липа, нана) које су анализирали Senila и сарадници (2014), може се закључити да екстракти дивље малине и купине садрже веће концентрације есенцијалних елемената од узгајаних врста биљака, а добијени резултати су у складу са резултатима испитивања Aldakheel и сарадника (2021). Присуство есенцијалних елемената није изненађујуће имајући у виду да су они неопходни за живот организама и да учествују у активирању ензима и производњи хормона (Ngigi and Muraguri, 2019). Потврђено је такође да различити делови биљака садрже различите количине минерала; листови биљака садрже веће количине натријума, калијума, калцијума и мангана у односу на остале делове биљака (Vinodkumar et al., 2025). На количину минерала у екстракту у значајној мери утичу техника екстракције и врста растварача, али и услови екстракције попут температуре, рН средине, времена екстракције, припреме биљног материјала, итд. (Sun et al., 2025; Mitić et al., 2019).

Поређењем резултата ICP-OES (таб. 9) и EDS (сл. 30) анализе може се закључити да је једино Mg на неки начин задржан на површини или у непосредној околини формираних наночестица, вероватно унутар биомолекула који га садрже, а активно учествују у стабилизацији и „затварању“ формираних AgNPs-E. Чист кристалографски образац из XRD дифрактограма (сл. 27) потврђује да је површински центрирано кубично језгро AgNPs-E највероватније формирано од чистог сребра за које је овај тип кристала карактеристичан.

4.1.6 DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица сребра

Динамичко расејање светлости (DLS) је техника која се користи за мерење величине наночестица у микро- и нанометарском опсегу. Метода се заснива на пропуштању монохроматске светлости кроз суспензију честица. Светлост различитог интензитета се расејава услед Брауновог кретања, а величина честица се затим мери коришћењем Штокс-Ајнштајнове (Stokes-Einstein) релације (Bidaki et al., 2022; Huq et al., 2022). Овом техником се мери хидродинамички пречник наночестица. Резултати хидродинамичке расподеле пречника синтетисаних AgNPs-E приказани су на слици 32 (Tasić et al., 2026).



Слика 32. DLS анализа AgNPs-E синтетисаних на собној температури и стабилованих помоћу екстракта добијеног мацерацијом (КМ СТ) (а) и AgNPs-E синтетисаних на температури кључања и стабилованих помоћу екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс (КР ТК) (б)

Важан фактор за одређивање особина честице је zeta-потенцијал, који дефинише стабилност честице и површинско наелектрисање. То је електрокинетички потенцијал на површини честице чија вредност показује степен електростатичког одбијања између честица. Добија се израчунавањем површине и броја пикова у зависности од наелектрисања честица у суспензији (Dara et al., 2020). Zeta-потенцијал, покретљивост, проводљивост и пречник AgNPs-E приказани су у табели 10.

Табела 10. Пречник, zeta-потенцијал, покретљивост и проводљивост синтетисаних AgNPs-E

Узорак	Z-потенцијал, [mV]	Мобилност, [μmcm/Vs]	Проводљивост, [mS/cm]	Величина честице, d [nm]
КМ СТ	-27,7	-2,171	0,568	51,51
	-25,3	-1,986	0,590	51,30
	-24,6	-1,927	0,602	49,98
КР ТК	0,0661	-0,005181	0,00738	76,60



-0,719	-0,05638	0,00797	73,52
0,123	0,009613	0,0201	73,31

Скраћенице су дате у опису слике 32.

Познато је да на измерени zeta-потенцијал утичу својства честица, као што је густина наелектрисања, али и састав и јонска јачина растварача. Zeta-потенцијал и покретљивост наночестица су повезани тако да се потенцијал може одредити из покретљивости наночестица, док покретљивост честица зависи од њихове концентрације и површинског наелектрисања (Lowry et al., 2016). Средња вредност измереног zeta-потенцијала синтетисаних AgNPs-E била је $-25,87 \text{ mV}$ и $-0,3027 \text{ mV}$ за КМ СТ и КР ТК, респективно. Високо негативно или високо позитивно наелектрисање изазива међусобно одбијање, што доводи до формирања стабилних честица, са малом тенденцијом агрегације. Стабилне дисперзије обухватају вредности zeta-потенцијала у опсегу $20 - 30 \text{ mV}$ (Baldassarre et al., 2015). Што је већа негативна вредност zeta-потенцијала, то су наночестице стабилније и мање долази до агломерације током формирања. Биоактивне компоненте екстракта играју важну улогу јер формирају слој за „затварање“ AgNPs-E током зелене синтезе.

Табела 10 приказује резултате који указују на значајне разлике у зависности од услова синтезе (собна температура и температура кључања) и примене различитих техника екстракције (мацерација и рефлукс). Због ограничених ресурса, анализирани су узорци одабрани на основу њихове стабилности, процењене помоћу UV-Vis спектроскопије, као што је био случај и код SEM анализе. Узорак синтетисан на собној температури и стабилизован екстрактом добијеним мацерацијом на собној температури (КМ СТ) показао је релативно високу негативну вредност. Овај резултат сугерише да стабилност формираних честица у великој мери зависи од услова синтезе, тј. да су AgNPs-E синтетисане под блажим условима синтезе, користећи екстракт добијен на собној температури, значајно стабилније у односу на оне синтетисане на температури кључања. Може се закључити да блажи услови екстракције и синтезе у већој мери чувају биомолекуле који стабилизују наночестице. Имајући у виду овако значајне разлике у параметрима из табеле 10, могуће је, и овај пут, индиректно закључити да биоактивна једињења из екстракта играју важну улогу у формирању заштитног слоја око наночестица сребра током зелене синтезе, тј. на коначне особине формираних честица.

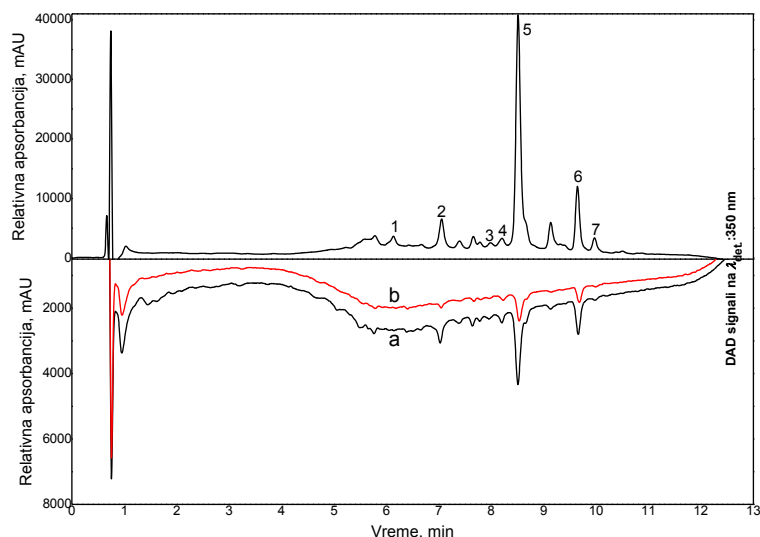


Просечна величина синтетисаних наночестица добијених DLS анализом била је 50,93 nm и 74,48 nm, за КМ СТ и КР ТК, респективно. Евидентно је да је DLS анализа показала веће вредности просечне величине честица у односу на оне добијене XRD анализом. Уочена разлика се може приписати различитим механизмима мерења на којима се базирају дифракција рендгенских зрака (XRD) и динамичко расејање светлости (DLS). Наиме, XRD одређује величину самих кристалита, који су уређени региони унутар саме наночестице, тј. само метално језгро наночестице. Насупрот томе, DLS мери укупну величину наночестица, укључујући димензије свих околних агенаса за „затварање“ тј. стабилизацију (биомолекула у овом случају), заједно са самим металним језгром (Sujitha and Kannan, 2013). Ова чињеница, тј. разлика у величини честица мерена наведеним методама, представља још један посредан доказ да су биомолекули из екстракта фиксирани са спољне стране честица формирајући тзв. затварајући и стабилизациони слој.

4.1.7 UHPLC-MS анализа екстракта и наночестица сребра

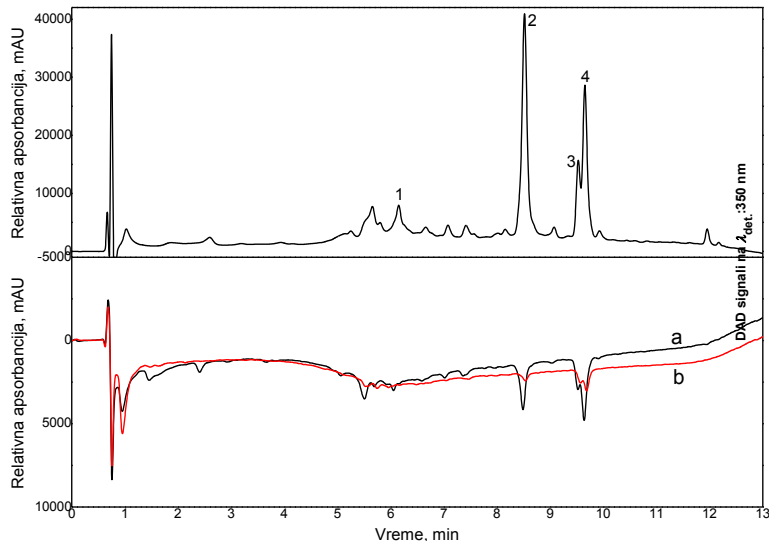
Течна хроматографија ултра-високих перформанси у комбинацији са масеном спектрометријом (UHPLC-MS) представља аналитичку технику која комбинује високу ефикасност раздвајања течном хроматографијом са осетљивом детекцијом и идентификацијом масеном спектрометријом. UHPLC-MS представља једну од најзначајнијих аналитичких техника за анализу сложених смеша једињења и налази широку примену у различитим областима, као што су фармација, биомедицина, анализа хране, екологија и фитохемија.

Да би се предвидело која врста присутних једињења у највећој мери учествује у редукцији Ag^+ јона и стабилизацији AgNPs-E, екстракти и супернатанти добијени након центрифугирања AgNPs-E, 5 минута на 13500 обртаја, подвргнути су UHPLC-MS анализи. Хроматограм екстракта малине добијен екстракцијом уз рефлукс, заједно са хроматограмима супернатаната наночестица сребра стабилованих екстрактом из листа малине (AgNPs-M), приказани су на слици 33 (Stevanović et al. 2019).



Слика 33. UHPLC-MS хроматограм воденог екстракта листа малине добијеног екстракцијом уз рефлукс (горњи део). Хроматограми супернатаната AgNPs-M синтетисаних на собној (а) и температури кључања (б) (доњи део). Идентификована једињења су нумерисана на хроматограмима

Хроматограм екстракта купине добијеног екстракцијом уз рефлукс заједно са хроматограмима супернатаната наночестица сребра синтетисаних употребом овог екстракта (AgNPs-K) приказан је на слици 34.



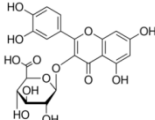
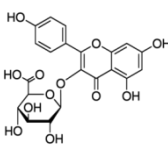
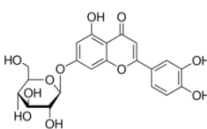
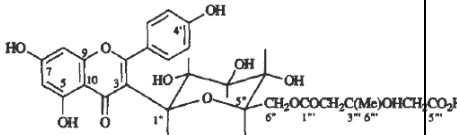
Слика 34. UHPLC-MS хроматограм воденог екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (горњи део). Хроматограми супернатаната AgNPs-K синтетисаних на собној (а) и температури кључања (б) (доњи део). Идентификована једињења су нумерисана на хроматограмима

Листа идентификованих једињења, за које је, на основу смањења интензитета пикова у UHPLC-MS хроматограмима, доказано да су активнија у стабилизацији AgNPs-E дата је у табели 11. Израчунат је удео површине пика сваког идентификованог једињења у

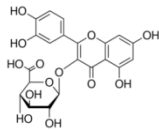
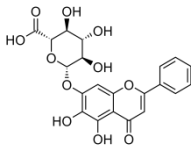
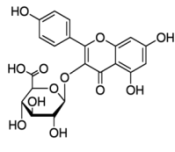
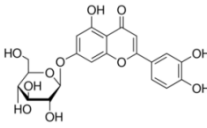


укупној површини пикова (свих идентификованих једињења) да би се предвидела могућа разлика у способности биомолекула за стабилизацију AgNPs-E и редукцију Ag⁺ јона.

Табела 11. Листа једињења идентификованих UHPLC-MS анализом у воденим екстрактима добијеним екстракцијом уз рефлукс из листова малине и купине, и супернатантима након синтезе и центрифугирања AgNPs-E на собној температури (СТ) и температури кључања (ТК) (Stevanović et al. 2019)

Пик бр.	Рет. време (min)	Једињење (спектралне карактеристике)	Удео површине пика*			Структуре (или Mw) идентификованих молекула
			Екстракт	Супенатант		
				СТ	ТК	
Малина						
1.	6,15	Фенолна киселина 1 UV-Vis: 327/300 nm; MS/MS: 319(100%),297,229	0,024	0,006	0,009	Mw = 365
2.	7,05	Флавоноид UV-Vis: 358/257 nm	0,072	0,079	0,043	Mw = 608
3.	7,98	Фенолна киселина 2 UV-Vis: 315 nm; MS/MS: 393(100%)	0,08	0,17	0,189	Mw = 438
4.	8,22	Фенолна киселина 3 UV-Vis: 322nm	0,044	0,128	0,149	-
5.	8,51	Кверцетин глукуронид UV-Vis: 356/258nm; MS/MS: 301(100%),179,151	0,59	0,396	0,372	 [Dueñas i sar., 2008]
6.	9,64 и 9,70	Кемферол-3-Глукуронид MS/MS: 285(100%)/284,175 и лутеолин-7-О-глукозид MS/MS: 284(100%)/285,255,227 UV-Vis: 352/347/267 nm	0,16	0,2	0,22	 MassBank record: PR100967**  [Li i sar., 2016]
7.	9,95	Кемпферол-3-О-(хидрокси-3-метилглутарат-хексозид) UV-Vis: 347/267 nm MS/MS: 544,529,447(100%),285	0,028	0,015	0,016	 [Spínola i sar., 2015]



Купина						
1.	6,15	Фенолна киселина 4 UV-Vis: 327/300 nm	0,042	0,013	0,007	Mw=365
2.	8,50	Кверцетин глукуронид UV-Vis: 356/258 nm MS/MS: 301(100%),179,151	0,435	0,323	0,309	 [Dueñas i sar., 2008]
3.	9,53	Баикалин UV-Vis: 335/270 nm; MS/MS: 377,309,269(100%)	0,159	0,19	0,198	 MassBank record: PR100652**
4.	9,64 и 9,70	Кемферол-3- Глукуронид MS/MS: 285(100%)/284,175 и лутеолин-7- О-глюкозид MS/MS: 284(100%)/285,255,2 27 UV-Vis: 352/347/267 nm	0,36	0,47	0,485	 MassBank record: PR100967**  [Li i sar., 2016]

*Удео површине појединачног пика у укупној површини пикова

** MassBank link: <https://massbank.eu/MassBank/Search>

Удели су израчунати коришћењем апсолутних вредности површина пикова добијених из хроматограма помоћу софтверског пакета наведеног у Експерименталном делу. Према израчунатим уделима може се закључити да је однос анализираних једињења промењен током синтезе AgNPs-E, односно, да се удели у екстрактима значајно разликују од оне у супернатантима, што је посебно уочљиво код екстракта малине (таб. 11). Разлике у израчунатим уделима сугеришу да постоји разлика у способности (реактивности) једињења из екстракта за редукцију Ag⁺ јона, иако углавном припадају истој групи молекула тј. фенолима.

Најзаступљенија једињења у екстрактима малине (сл. 33) идентификована су као кверцетин глукуронид (бр. 5) и кемпферол-3-глукуронид (бр. 6) (таб. 11). На основу хроматограма и релативног односа пикова, кверцетин глукуронид је више укључен у AgNP-M у поређењу са кемпферол-3-глукуронидом. У циљу квантификације ове претпоставке, односи удела за пикове бр. 5 и 6 израчунати су као 3,69 (екстракт), 1,98 (собна температура) и 1,69 (температура кључања). Значајно смањење овог односа је



снажан доказ да кверцетин глукуронид учествује у редукцији Ag^+ јона, формирању и стабилизацији AgNPs у много већој мери у поређењу са кемпферол-3-глукуронидом. Слична анализа се може применити на друге пикове, односно једињења. Пик бр. 7 је идентификован као кемпферол-3-*O*-(хидрокси-3-метилглутар-хексоид); аналогно поређење са кемпферол-3-глукуронидом (бр. 6) дало је односе 5,71 (екстракт), 13,34 (СТ) и 13,75 (ТК), што сугерише да је кемпферол-3-*O*-(хидрокси-3-метилглутарни-хексоид) уграђен у синтетисаним AgNPs-M у значајно већој мери него кемпферол-3-глукуронид. Изгледа да додатна хидроксилна функционална група фаворизује молекул за редукцију Ag^+ јона и стабилизацију формираних наночестица. Такође, може се приметити да су и једињења бр. 1 и 2 (сл. 33) значајно ангажована у формирању наночестица. Једињења под бр. 1 и 4 идентификована су као фенолне киселине и њихови односи фракција 1,84 (екстракт), 21,33 (собна температура) и 16,55 (температура кључања) указују на значајну разлику у способности редукције Ag^+ јона и стабилизације AgNPs-M.

Идентификована једињења из хроматограма екстракта листа купине и супернатаната AgNPs-K (сл. 34) наведена су такође у табели 11. Удели пикова се мењају у супернатантима након синтезе AgNPs-K на собној температури и температури кључања у поређењу са екстрактом. Најинтензивнији пикови бр. 2 и 4 идентификовани су као кверцетин глукуронид и мешавина кемпферол-глукуронида и лутеолин-7-*O*-глюкозида, респективно. Односи удела ових пикова у екстракту и супернатантима израчунати су као 1,21 (екстракт), 0,69 (собна температура) и 0,64 (температура кључања), што указује на већу активност кверцетин глукуронида у поређењу са смешом. Интензитет осталих пикова је смањен у супернатантима, посебно након синтезе при температури кључања. Фенолна киселина идентификована преко пика бр. 1 (сл. 34) је јако инкорпорисана током синтезе на обе реакционе температуре, што је додатно илустровано кроз релативно поређење са уделом пика бр. 2, дајући однос удела 10,35 (екстракт), 24,85 (собна температура) и 44,14 (температура кључања).

Треба нагласити да смањење интензитета неких пикова у супернатантима након синтезе AgNPs-E при температури кључања (сл. 33 и 34) може бити последица њихове термичке деградације. Таква могућност је избегнута код AgNPs-E синтетисаних на собној температури, где су разлике у односима удела површине пикова и даље присутне. Имајући ово у виду, може се закључити да су једињења из добијених екстраката сигурно укључена у формирању и стабилизацији AgNPs-E путем редукције Ag^+ јона. Недвосмислено је такође показано да су присутна једињења показала



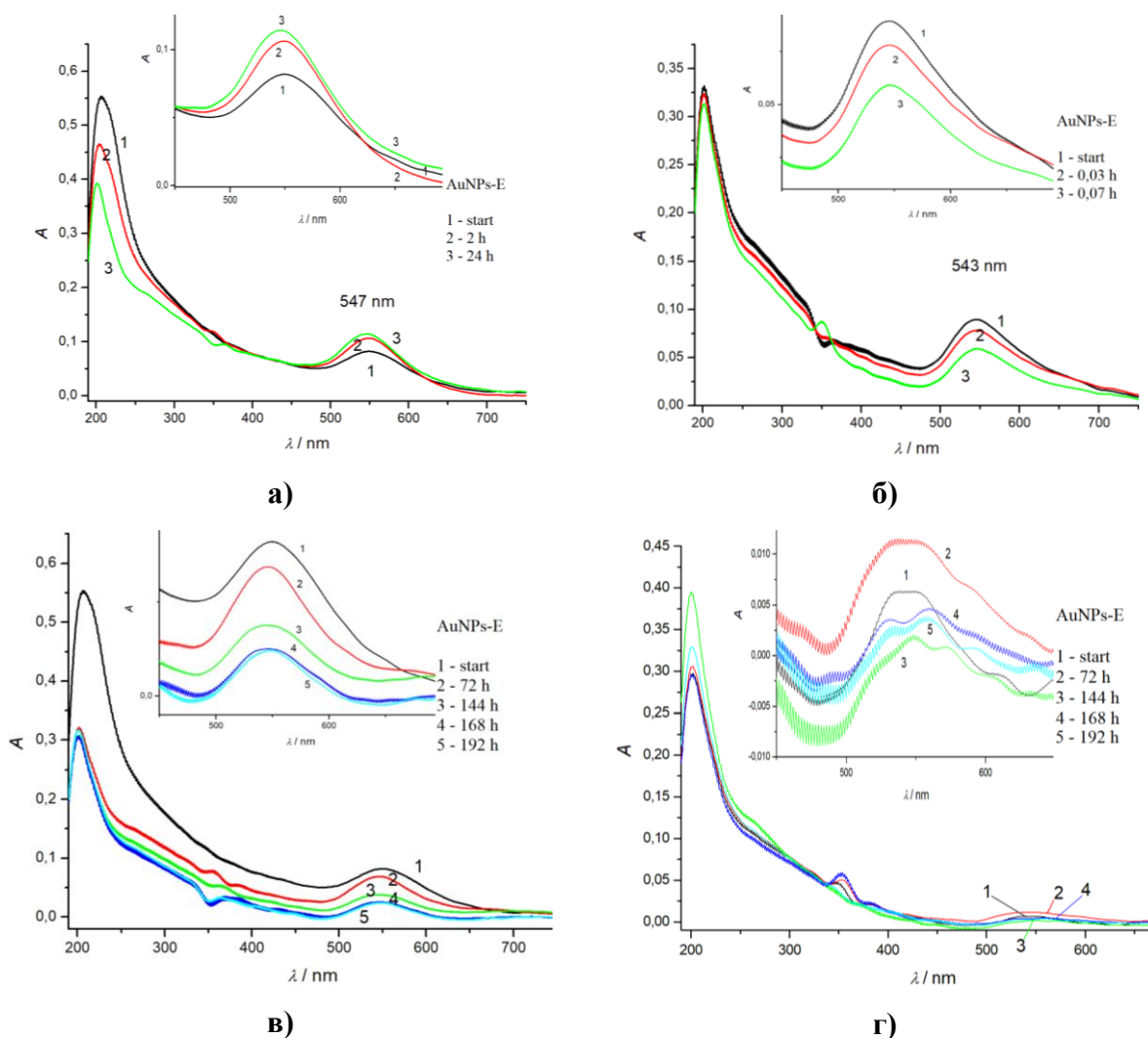
различиту реактивност у датом систему у зависности од њихове структуре. Изгледа да додатне функционалне групе у структури, као што је хидроксилна група, фаворизују молекул за ову врсту реакције. Имајући ово у виду, резултати добијени овако дизајнираним експериментом требало би да буду добра полазна тачка у даљим истраживањима односа структуре и активности, и побољшању експерименталне поставке будућих експеримената овог типа (Stevanović et al. 2019).

4.2 Синтеза и карактеризација наночестица злата

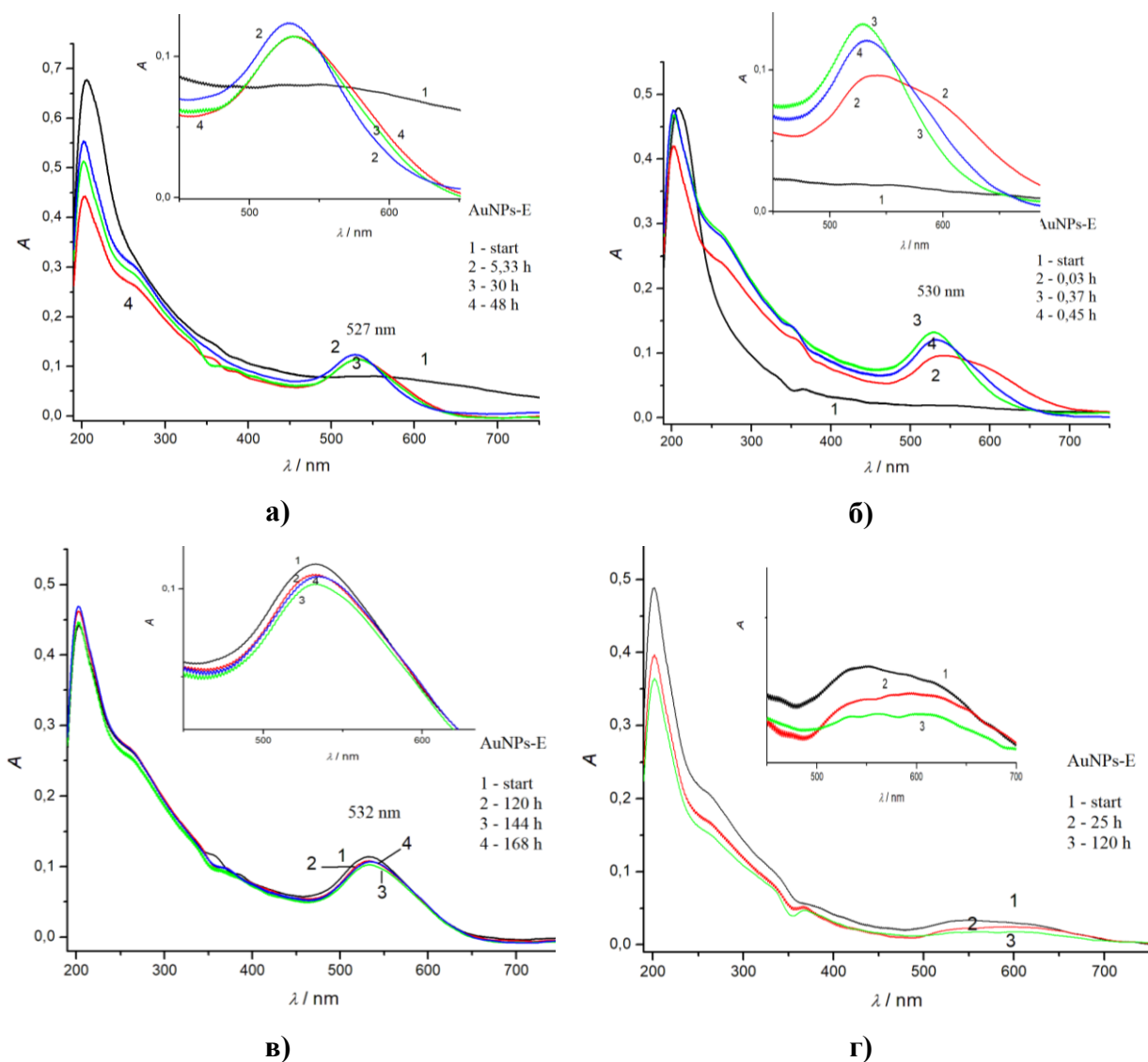
Наночестице злата (AuNPs-E) су такође синтетисане воденим екстрактима листа малине и купине добијеним мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања. Међутим, на основу горе презентованих резултата, и ограничених ресурса, одлучено је да AuNPs-E синтетисане и стабилизоване екстрактима листа купине буду експлоатисане у већој мери, будући да су се ови екстракти показали као агенси који дају најстабилније наночестице сребра. Део резултата ових истраживања је презентован у публикацији (Tasić et al. 2024).

4.2.1 UV-Vis спектрофотометрија екстраката и наночестица злата

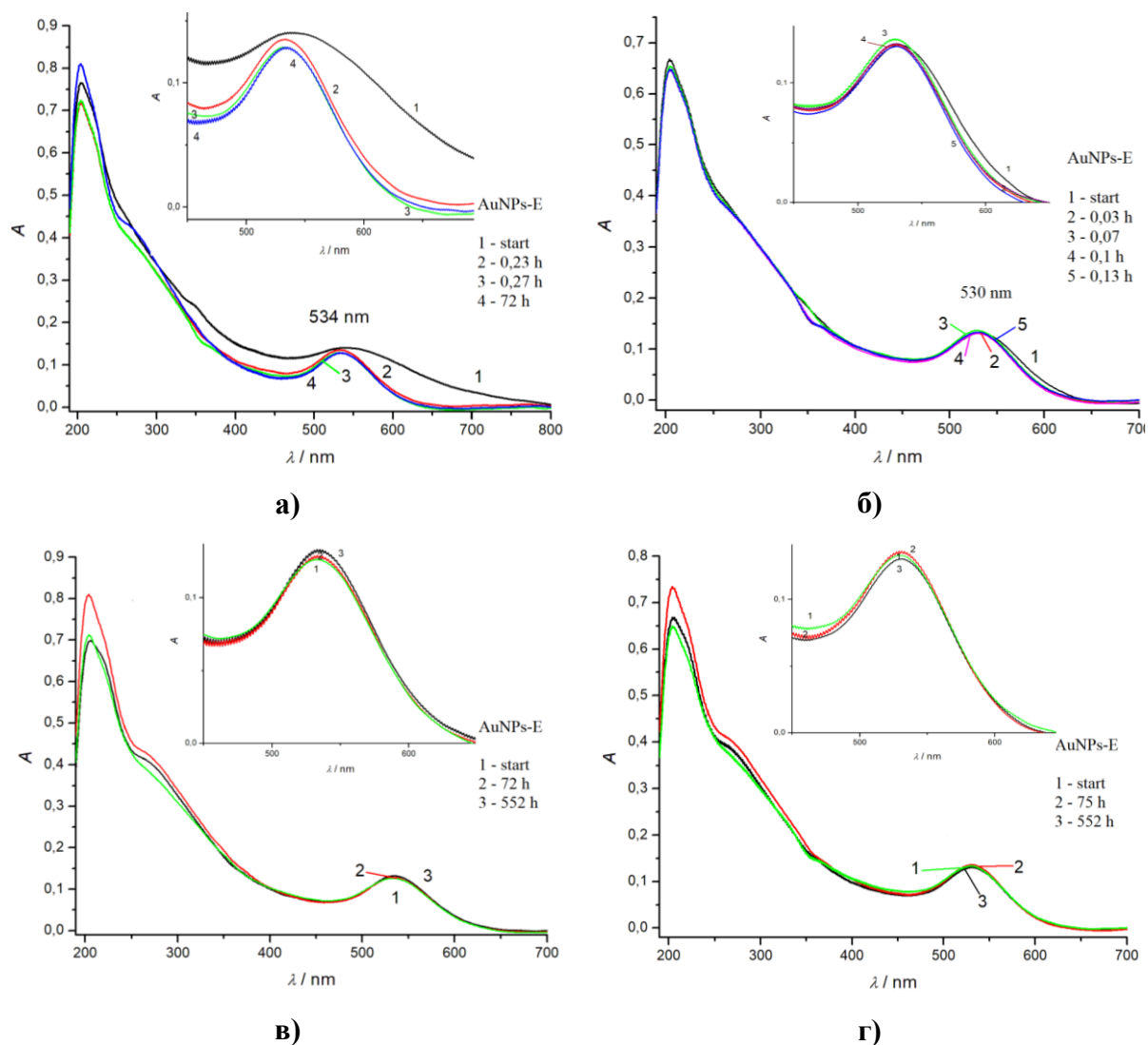
Синтезе AuNPs-E, стабилованих воденим екстрактима листова малине и купине, извршене су на собној температури и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Формирање наночестица је и у овом случају праћено променом боје (Cudalbeanu et al., 2021; Kumari et al., 2020; Elbagory et al., 2016; Reddy et al., 2015), тако да су синтезе квалитативно праћене снимањем UV-Vis спектра у одређеним временским интервалима, а упоредни приказ спектра дат је на слици 35. Стабилност синтетисаних AuNPs-E је такође праћена снимањем UV-Vis спектра након одређених временских интервала складиштења узорака на собној температури у мраку. Неки од снимљених спектра су приказани на слици 35, са упоредном презентацијом више спектра у циљу илустрације погодности UV-Vis спектрофотометрије за праћење самог тока синтезе, али и стабилности синтетисаних наночестица. Као што је напоменуто раније, суспензије са највећим садржајем синтетисаних наночестица су коришћене за даља истраживања, а спектри суспензија након максимума приноса су приказани илустративно.



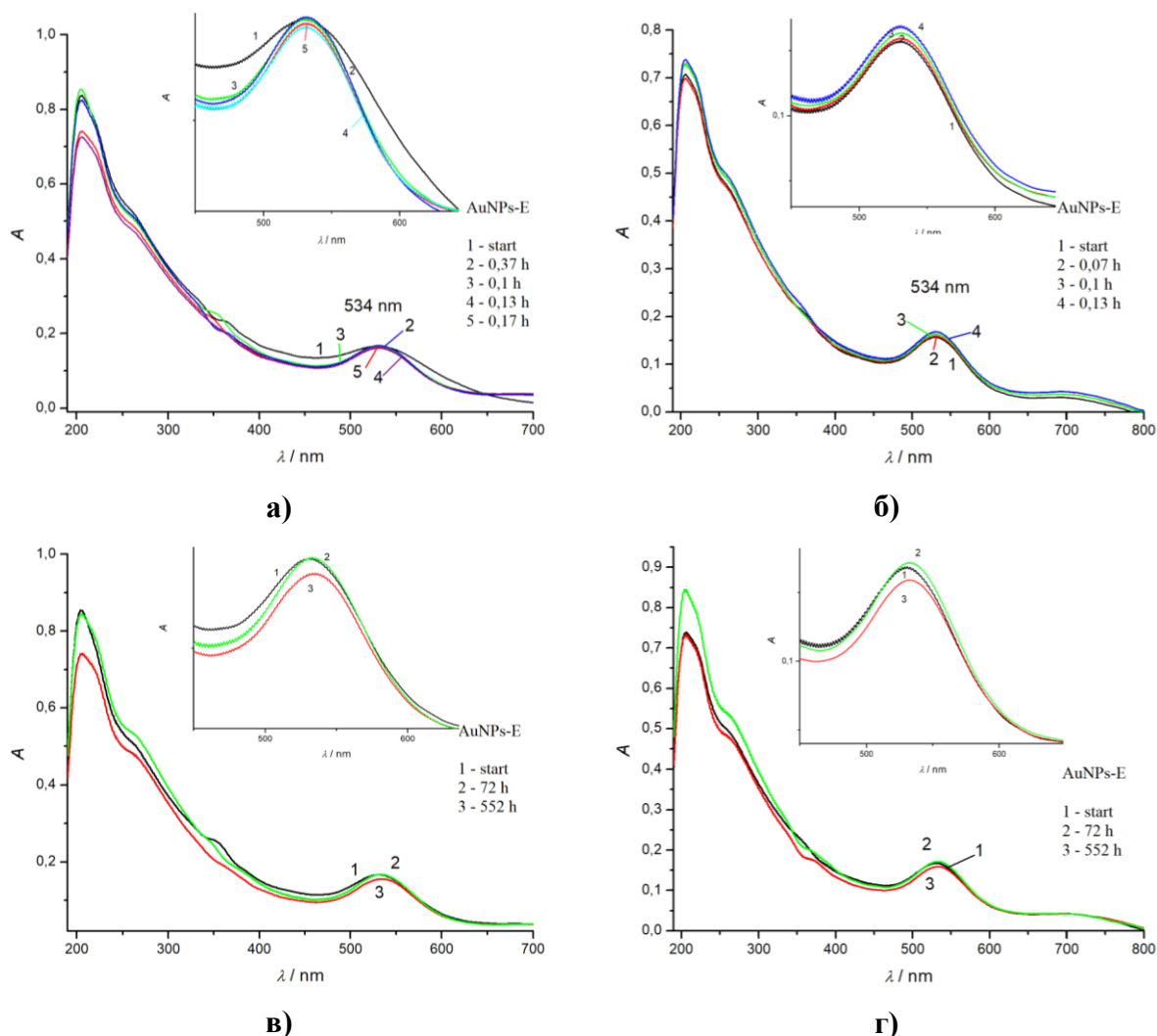
Слика 35. Синтеза (**а** и **б**) и проверка стабилности (**в** и **г**) синтетисаних AuNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри AuNPs-E синтетисаних на собној температури помоћу екстракта листа малине добијеног мацерацијом на собној температури (ММ СТ) (**а**), као и синтетисаних на $T = 80^\circ\text{C}$ помоћу екстракта листа малине добијеног мацерацијом (ММ 80) (**б**). Стабилност праћена током времена за AuNPs-E синтетисане на собној температури (**в**) и $T = 80^\circ\text{C}$ (**г**)



Слика 36. Синтеза (**а** и **б**) и провера стабилности (**в** и **г**) синтетисаних AuNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри AuNPs-E синтетисаних на собној температури помоћу екстракта листа малине добијеног екстракцијом уз рефлукс (MP CT) (**а**), као и синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ помоћу екстракта листа малине добијеног екстракцијом уз рефлукс (MP 80) (**б**). Стабилност праћена током времена за AuNPs-E синтетисане на собној температури (**в**) и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**г**)



Слика 37. Синтеза (**а** и **б**) и провера стабилности (**в** и **г**) синтетисаних AuNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри AuNPs-E синтетисаних на собној температури помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури (KM CT) (**а**), као и синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом (KM 80) (**б**). Стабилност праћена током времена за AuNPs-E синтетисане на собној температури (**в**) $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**г**)



Слика 38. Синтеза (**а** и **б**) и провера стабилности (**в** и **г**) синтетисаних AuNPs-E током стајања на собној температури у мраку (временски интервали су дати на самим сликама); UV-Vis спектри AuNPs-E синтетисаних на собној температури помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (KP CT) (**а**), као и синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (KP 80) (**б**). Стабилност праћена током времена за AuNPs-E синтетисане на собној температури (**в**) $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**г**)

Синтеза AuNPs-E употребом екстракта листа купине праћена је променом боје реакционе смеше из светло жуте у љубичасту. AuNPs-E су честице настале „зеленом“ синтезом, тј. редукцијом Au^{3+} јона молекулима из природног материјала будући да је сам екстракт извор редукционих агенаса за формирање наночестица. Процес синтезе је праћен појавом SPR траке на $\sim 530\text{ nm}$, што је већ примећено у синтези AuNPs коришћењем екстракта листова *Euphorbia hirta* (Annamalai et al., 2013) или *Croton sparsiflorus* (Boomi et al., 2020). Колективне осцилације слободних електрона у металима називају се „плазмони“. У случају AuNPs, долази до појаве локализоване



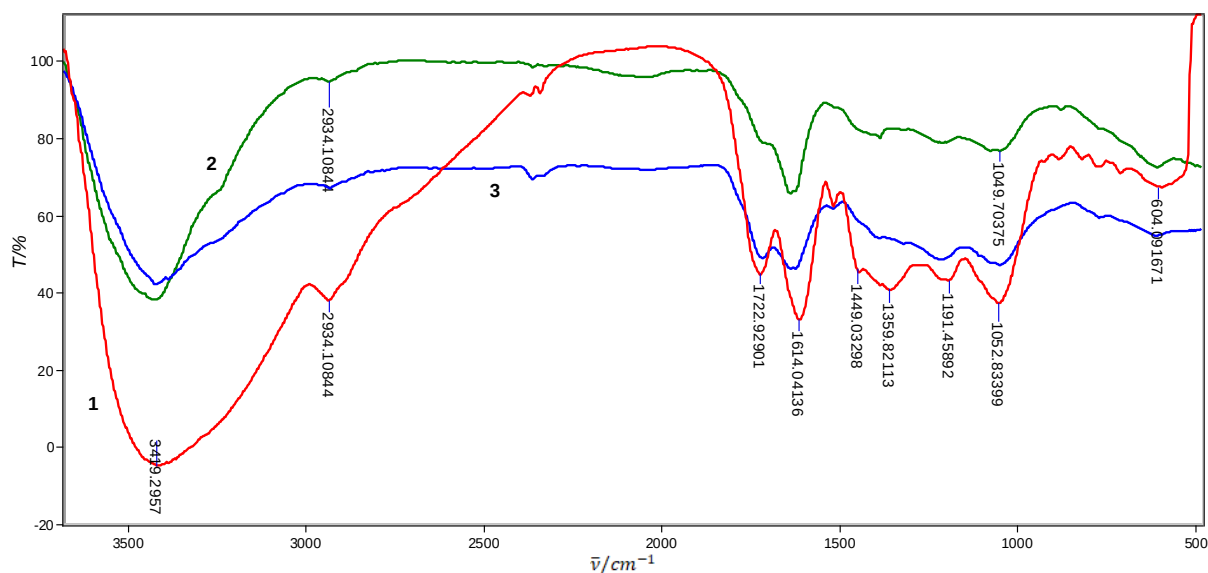
површинске плазмонске резонансе (LSPR) која се јавља услед интеракције електромагнетног зрачења са слободним електронима на површини металне наночестице. Ова појава се често моделује као систем масе и опруге, где је маса еквивалентна ефективној маси колективно осцилујућих слободних електрона, а сила опруге представља повратну силу услед позитивног набоја језгра. Резонантна фреквенција LSPR зависи од величине, облика и окружења наночестица, као и од густине слободних електрона у металу (Amendola et al., 2017). Интензитет SPR траке расте са временом синтезе, што указује на континуирано смањење Au јона и повећање концентрације AuNPs-E. Формирање AuNPs-E почиње у року од 8 min, а интензитет SPR траке се повећава до 28 min; након тога је интензитет SPR траке прилично стабилан више од 20 дана на собној температури у мраку (посебно приметно на сл. 37 и 38). Спектри приказани на овим сликама (35 – 38) још једном илуструју горе споменут закључак да су екстракти из листа купине дали стабилније наночестице (сл. 37 и 38) у поређењу са екстрактима из листа малине (сл. 35 и 36); то је био један од главних критеријума за селекцију AuNPs-E синтетисаних екстрактима из листа купине (добијених мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања) за даља истраживања. Појава широке SPR траке указује на формирање AuNPs-E наночестица различитих облика (штапићастих, троугластих и правоугаоних) (Boomi et al., 2020; Boomi et al., 2019), што је потврђено и SEM анализом. У поређењу са AgNPs-E, синтеза AuNPs-E употребом истих екстраката траје краће, односно завршава се већ након 28 минута. Ова разлика у времену синтезе може се приписати већем редукционом потенцијалу злата (Au^{3+}) у односу на сребро (Ag^+), што доводи до брже редукције и формирања стабилних наночестица уз примену истог екстракта (Joseph and Mathew, 2015). Спектри приказани на сликама 37 и 38 сугеришу да су формиране AuNPs-E прилично стабилне пошто SPR трака не трпи значајне промене у интензитету и положају током посматраног периода. Благо црвено померање максимума код КМ 80 и КР СТ (сл. 37г и 38в) сугерише на формирање AuNPs-E већег пречника и различитог облика у праћеном временском периоду. Теоријски прорачуни ефикасности апсорпције коришћењем дискретне диполне апроксимације (DDA) показали су смањени интензитет траке за злато због прелаза унутар самих трака. У исто време, тешко је утврдити геометрију наночестица према апсорпционим тракама пошто су оне јако широке и не откривају било какав посебан оптичко-геометријски потпис наночестица (Sosa et al., 2003). Познато је да облик SPR трака у спектру зависи од величине и облика наночестица, али и од услова спољашње средине као што су



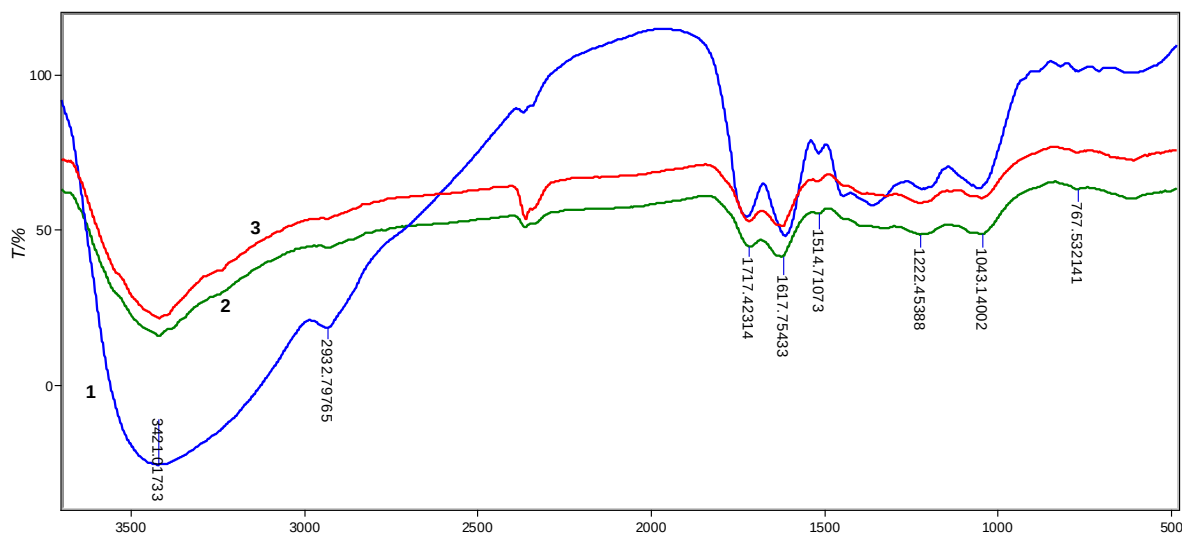
температура, индекс преламања растварача, диелектрична константа, итд. На основу литературних података могуће је претпоставити да SPR трака на ~ 530 nm углавном потиче од формираних наносфера и нанокочки у AuNPs-E суспензији (Chen et al., 2008).

4.2.2 FT-IR спектрофотометрија екстракта и наночестица злата

FT-IR спектри AuNPs-E синтетисаних на собној температури и $T = 80$ °C, преклопљени са спектрима екстракта добијеним мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, приказани су на сликама **39** и **40**, респективно.



Слика 39. Упоредни приказ FT-IR спектра екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури (**1**), AuNPs-E синтетисаних на собној температури (KM CT) (**2**) и AuNPs-E синтетисаних на $T = 80$ °C (KM 80) (**3**) употребом овог екстракта



Слика 40. Упоредни приказ FT-IR спектра екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (1), AuNPs-E синтетисаних на собној температури (KP CT) (2) и AuNPs-E синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KP 80) (3) употребом овог екстракта

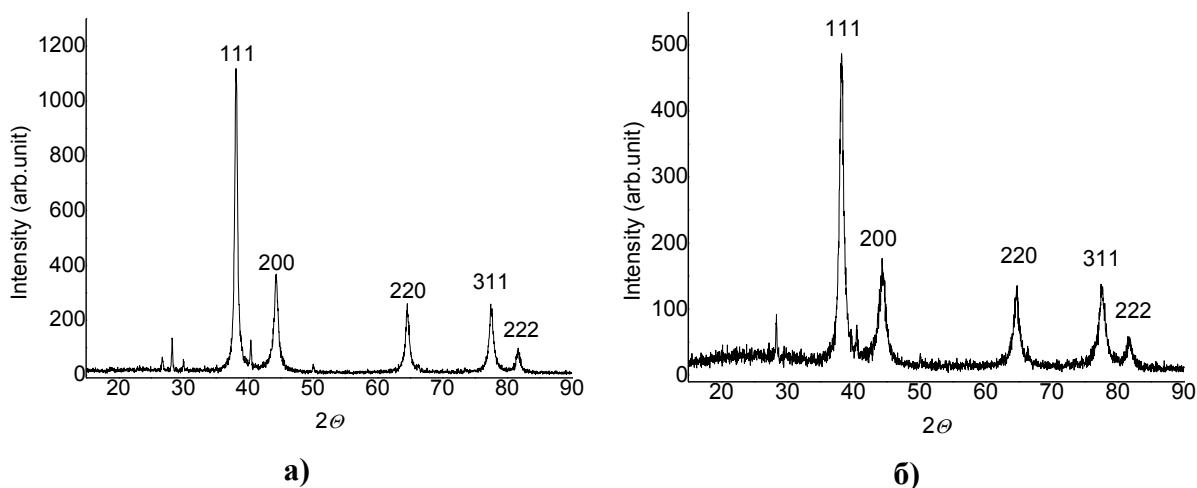
Биомолекули из екстраката листа купине добијених мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс активно учествују у редукцији Au јона и стабилизацији AuNPs-E преко својих функционалних група, што се може приметити по значајном смањењу интензитета трака у FT-IR спектрима AuNPs-E у поређењу са спектрима екстраката (сл. 39 и 40). Као што је већ речено, екстракти коришћени за синтезу наночестица злата анализирани су UHPLC-MS хроматографијом (Stevanović et al., 2019), којом је утврђено да идентификована једињења углавном припадају фенолној групи молекула са кверцетин глукуронидом, баикалином, кемпферол–глукуронидом и лутеолин-7-*O*-глюкозидом као најзаступљенијим. Са становишта корелације структуре и активности, кверцетин глукуронид, заједно са фенолним киселинама, су предложени као најефикаснији у редукцији Ag јона и стабилизацији AgNPs-E (Stevanović et al., 2019). Имајући ово у виду, може се претпоставити да је иста класа једињења одговорна за редукцију Au јона и стабилизацију AuNPs-E. Наиме, изгледа да хидроксилне групе биомолекула-стабилизатора делују као један од најактивнијих центара према значајном смањењу интензитета траке у опсегу $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ (ν_{OH}). Значајно смањење интензитета траке у опсегу од $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$, које потиче од валентних (ν_{CH}) вибрација $-\text{CH}_2$ група, сугерише да су ове групе такође укључене у стабилизацији AuNPs-E. Траке у области $1713 - 1723\text{ cm}^{-1}$ и $1617 - 1640\text{ cm}^{-1}$ су асигниране као $\nu_{\text{C=O}}$ или $\nu_{\text{C=C}}$ вибрације од полифенола и органских киселина, док трака на $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ (сл. 39) вероватно потиче од δ_{CH} и/или δ_{OH} вибрација алкохола. Пошто је присуство полифенола, органских киселина, гликозида,

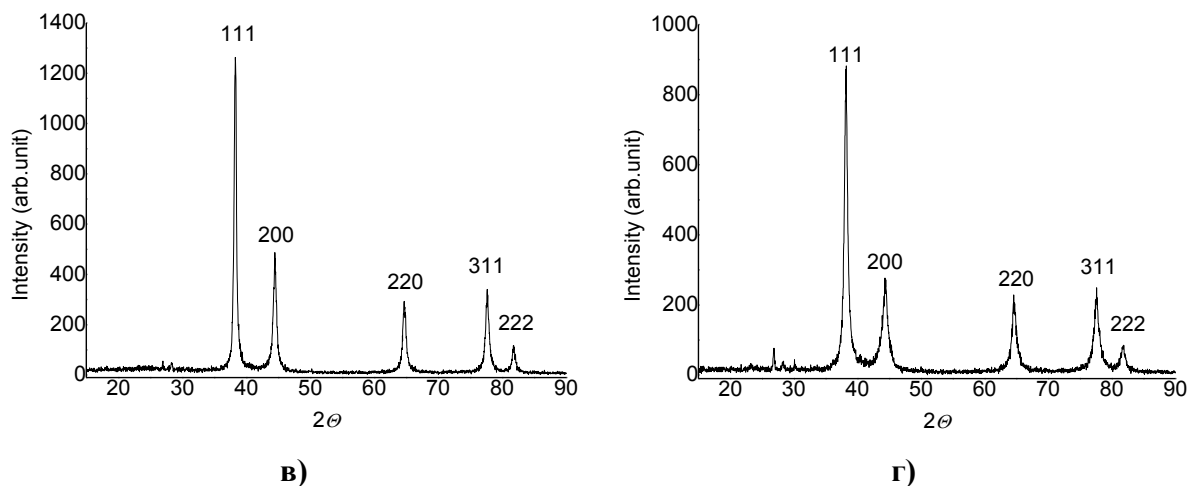


алкохола итд. доказано UHPLC-MS анализом (Stevanović et al., 2019), траке у опсегу $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ вероватно потичу од $\nu_{\text{C-O}}$ и $\nu_{\text{C-O-C}}$ вибрација (El-Borady et al., 2020; Ahmad et al., 2019). Траке на $\sim 770 \text{ cm}^{-1}$ (сл. 40) су приписане деформационим C–H вибрацијама ван равни, које указују на присуство полифенола (Sakić et al., 2018). На основу приказаних FT-IR спектра може се закључити да је интензитет свих наведених трака значајно смањен након редукције Au јона и формирања AuNPs-E. Траке у неким областима као што су $1713 - 1640 \text{ cm}^{-1}$ (сл. 39) практично нестају, док су неке од њих смањене и померене ка већем таласним бројевима ($\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$, сл. 39). Слично томе, интензитет трака на $\sim 1390 \text{ cm}^{-1}$, и оних у области од $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, такође је значајно смањен у спектрима AuNPs-E у поређењу са спектрима екстраката (сл. 39 и 40). Приказани резултати и овај пут сугеришу да једињења која садрже функционалне групе као што су C=O, C–O–C, OH група итд. (полифеноли, флавоноиди, тритерпеноиди, протеини, органске киселине итд.) играју главну улогу у редукцији Au јона и стабилизацији AuNPs-E.

4.2.3 XRD анализа наночестица злата

Кристална структура формираних AuNPs-E може се дефинисати снимањем XRD спектра. XRD сигнали синтетисаних наночестица са 2θ на око $38,2^\circ$, $44,4^\circ$, $64,6^\circ$, $77,5^\circ$ и $81,8^\circ$ одговарају (111), (200), (220), (311) и (222) равнима рефлексије, респективно. XRD дифрактограми AuNPs-E синтетисаних при различитим експерименталним условима приказани су на слици 41 (Tasić et al., 2024).





Слика 41. XRD дифрактограми AuNPs-E синтетисаних на собној температури (KM CT) и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KM 80) и стабилованих коришћењем екстракта листа купине добијеног мацерацијом (а и б, респективно); и AuNPs-E синтетисаних на собној температури (KP CT) и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KP 80) и стабилованих коришћењем екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (в и г, респективно)

Кристалографска раван (111), у структури површински центриране кубне решетке код AuNPs-E синтетисаних на собној температури и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (сл. 41), је интензивнија у поређењу са другим равнима (200), (220), (311) и (222). Просечна величина синтетисаних AuNPs-E процењена је на исти начин као код AgNPs-E, коришћењем Брагове рефлексije 2θ за (111), (200) и (220) равни рефлексije (видети поглавље 4.1.3), а резултати су дати у табели 12. Просечна величина кристалита истраживаних узорка била је у опсегу 12,3 – 18,7 nm, што је у складу са величином других AuNP стабилованих биљним екстрактима код којих је величина кристалита одређена сличном методом (Lee et al., 2016; Yuan et al., 2017; Biao et al., 2018). Lee и сарадници (2016) су испитивали синтетисане AuNPs-E стабиловане воденим екстрактом коре мангостина (*Garcinia mangostana*), при чему су добијене просечне величине кристалита износиле 16 nm. У раду Yuan и сарадника (2017) просечна величина кристалита износила је 11 nm за AuNPs-E стабиловане воденим екстрактом коре помела (*Citrus maxima*). Biao и сарадници (2018) су синтетисали AuNPs-E помоћу воденог екстракта из осушене и самлеване коре нара (*Punica granatum*), претходно испране петрол етром, и њихови резултати су показали просечну величину кристалита од 10,1 nm.

Табела 12. Величине кристалита синтетисаних AuNPs-E процењене XRD анализом

hkl	2θ [deg]	d [Å]	FWHM [deg]	Величина (nm)	
KM CT				XRD	
111	38,146	2,357	0,46	18,3	17,4±1



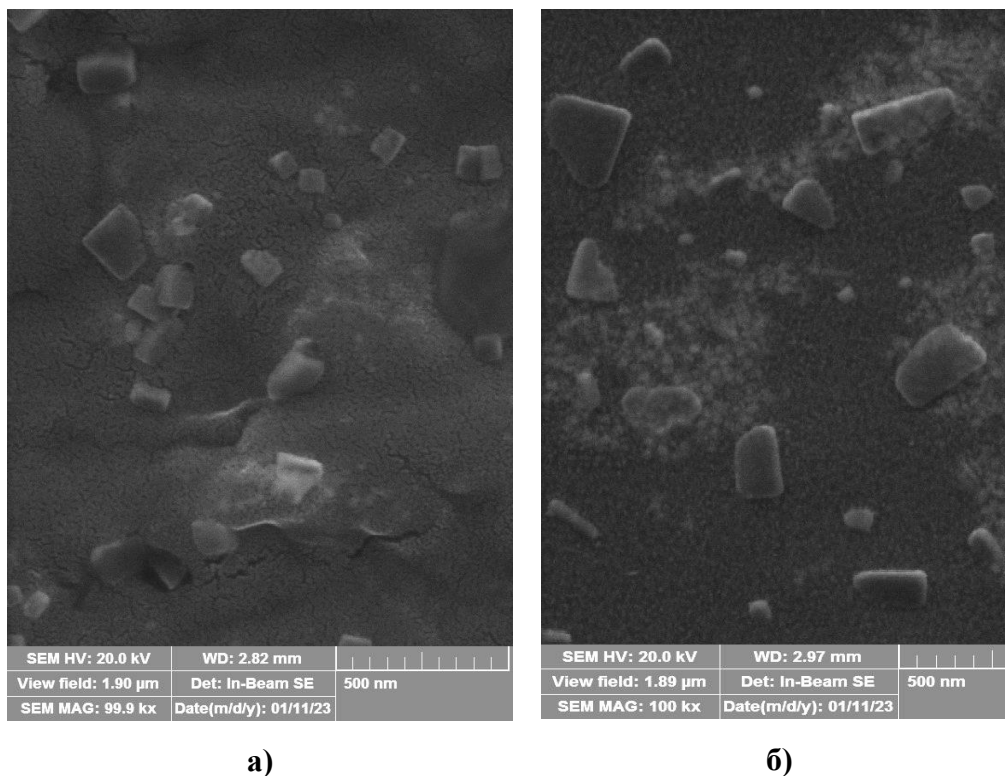
200	44,328	2,042	0,52	16,5	
220	64,573	1,442	0,54	17,4	
KM 80					
111	38,290	2,349	0,42	20,6	18,7±2
200	44,477	2,035	0,51	16,8	
220	64,676	1,439	0,51	18,4	
KP CT					
111	38,176	2,355	0,69	12,2	12,3±1
200	44,322	2,041	0,72	11,9	
220	64,662	1,440	0,74	12,7	
KP 80					
111	38.212	2,356	0,53	15,9	15,7±2
200	44,430	2,038	0,63	13,7	
220	64.580	1.442	0,53	17,7	

Скраћенице су дате у опису слике 41.

4.2.4 SEM анализа наночестица злата

Два примарна параметра која дефинишу физичка, хемијска и електрокаталитичка својства наночестица злата су величина и облик. Величина AuNPs је условљена агрегацијом изазваном хлоридним јонима из киселине и може се модификовати употребом различитих редукционих агенаса и прекурсора (Lee et al., 2019; Baruah et al., 2018; Kim et al., 2016). Што се тиче облика AuNPs, постоји разлика између анизотропног и сферног облика у погледу структурних, оптичких, електронских, магнетних и каталитичких својстава. У погледу димензија, AuNPs се могу поделити на једно-, дво-, тродимензионалне, разгранате, итд., укључујући наноштапиће, наножице, наноцеви, наноплоче, нанотегове, наноподе, нанозвезде, недендрите, итд. (Xie et al., 2017).

Морфологија површине синтетисаних AuNPs-E дефинисана је методом скенирајуће електронске микроскопије, а одабране микрографије приказане су на слици 42. Анализа је извршена на узорцима који су, према UV-Vis спектроскопским подацима, показали највећу стабилност током времена, што је приступ примењен и приликом одабира узорака наночестица сребра.



Слика 42. SEM микрофотографије AuNPs-E синтетисаних на собној температури, стабилованих помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури (KM CT) (а), и AuNPs-E синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, стабилованих помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (KP 80) (б)

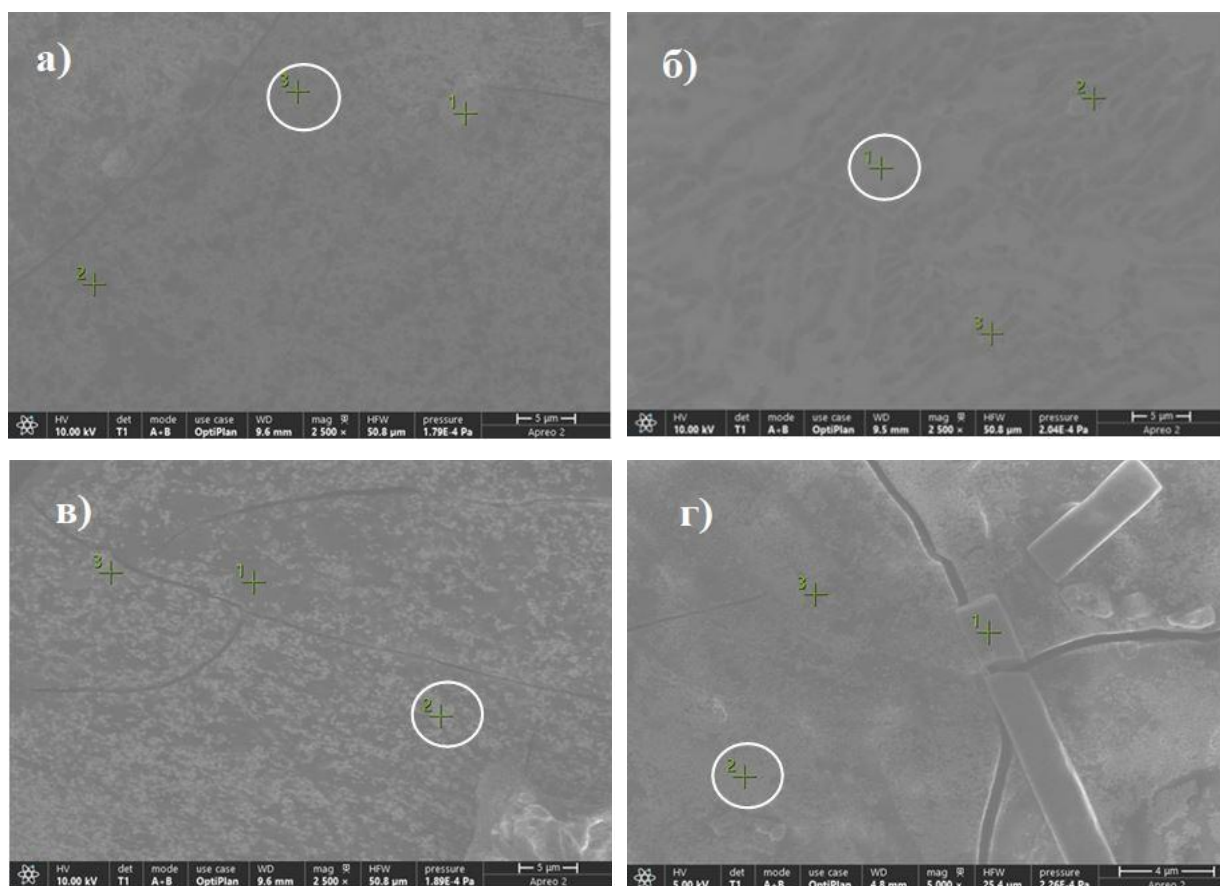
SEM микрографије показују да су синтетисане AuNPs-E углавном облика коцке, уз присуство и мање заступљених троугластих и штапићастих наночестица. Положај SPR трака у UV-Vis спектрима (сл. 37 и 38) такође указује на доминантан облик коцке формираних AuNPs (Sosa et al., 2003). Мешавину наночестица различитог облика приметили су и други аутори након зелене синтезе коришћењем биљних екстраката, закључивши да су облик и величина AuNPs осетљиви на концентрацију екстракта (Dehghani et al., 2022). До сличних резултата дошли су и Boomi и сарадници (2019) истраживањем AuNPs стабилованих воденим екстрактом листа *Croton sparsiflorus*, при условима сличним као у овом раду. Дакле, они су приметили да при нижим концентрацијама екстракта формиране наночестице имају облик луковице, док су при вишим концентрацијама екстракта формиране сферне наночестице. Испитивањем екстракта друге биљке (водени екстракт листова *Coleus aromaticus*), при различитим концентрацијама хлороауринске киселине, закључили су да при мањој концентрацији киселине долази до формирања неправилно сферних наночестица, док при већој концентрацији наночестице имају правилно сферну морфологију. Voruah и сарадници (2012) су дошли до сличних резултата истраживањем наночестица злата синтетисаних



воденим екстрактом из листова чаја (*Camellia Sinensis*) у различитим концентрацијама. Доказали су да долази до формирања наночестица неправилног сферног, шестоугаоног, троугластог и издуженог облика. Choudhary и сарадници (2017) су у свом истраживању применили водени екстракт семена коморача (*Foeniculum vulgare*) у различитим концентрацијама као стабилизациони агенс, при чему су добили наночестице углавном сферног облика, уз присуство мањег броја честица неправилног облика.

4.2.5 EDX анализа наночестица злата

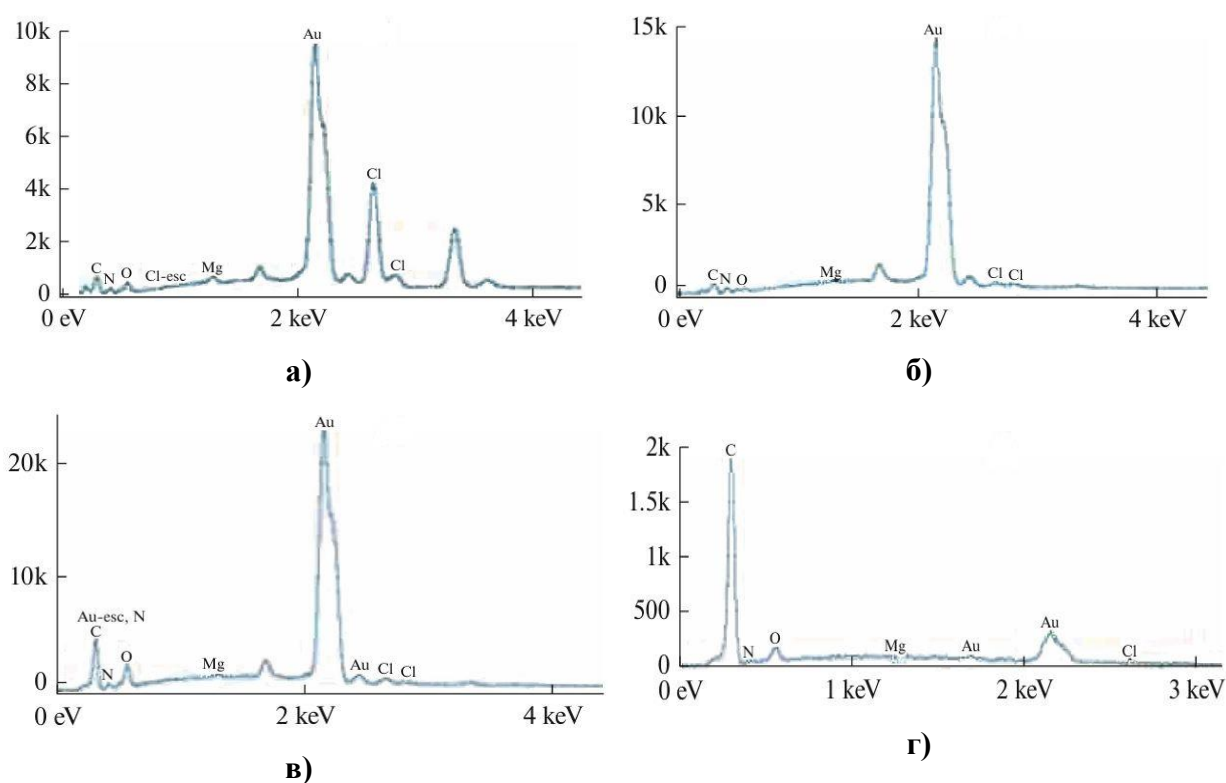
Квалитативна и квантитативна анализа синтетисаних AuNPs-E извршена је EDX спектроскопијом. EDX микрографије и EDX спектри испитиваних узорака приказани су на сликама 43 и 44, респективно.



Слика 43. EDX микрографије AuNPs-E синтетисаних на собној температури (КМ СТ) (а) и температури $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (КМ 80) (б) употребом екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури; и AuNPs-E синтетисаних на собној температури (КР СТ) (в) и температури од $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (КР 80) (г) употребом екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс



Формирање атома злата у AuNPs-E доказано је присуством пикова на приближно 2,2 keV (сл. 44) који потичу из SPR нанокристала злата (Bindhu and Umadevi, 2014). EDS спектри на слици 44, поред сигнала који одговарају елементарном Au, показују сигнале нижег интензитета од C, N, Mg и O који вероватно потичу од фитохемијских елемената присутних у екстрактима, као што је то случај и са AgNPs-E. Присуство Mg је доказано и ICP-OES анализом коришћених екстраката (видети поглавље 4.1.5.1). Презентовани резултати на посредан начин потврђују формирање AuNPs као дела већег агрегата, тј. AuNPs-E. Присуство Cl сигнала (слика 44) указује на малу преосталу количину AuCl_4^- јона (таб. 13).



Слика 44. EDS спектри AuNPs-E синтетисаних помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури (а) и температури од $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (б); и екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс на собној температури (в) и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (г)

Атомски и масени удели хемијских елемената у узорцима приказани су у табели 13. Проценат елементарног злата био је највећи у узорку КМ 80, а најмањи у узорку КМ СТ. Ово потврђује већу ефикасност синтезе AuNPs-E на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ коришћењем екстракта из листа купине добијеног мацерацијом на собној температури, што сугерише на већу ефикасност синтезе, тј. већу способност „затварања“ и јаче редукционе



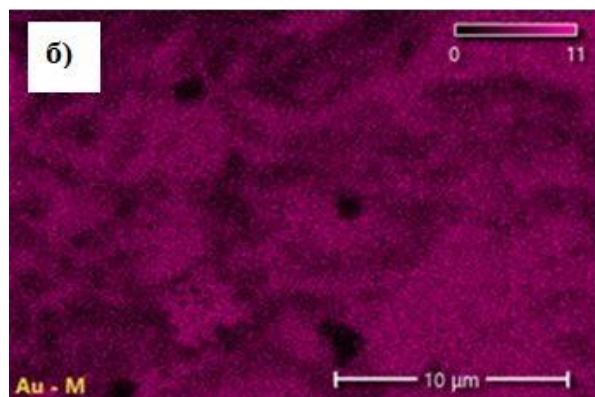
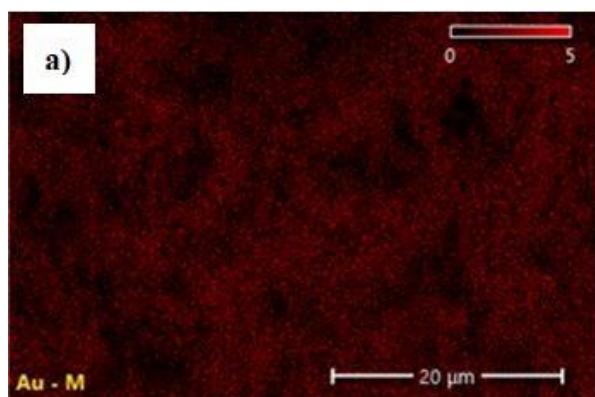
активности агенаса из екстракта, при енергичнијим условима. Реакциону температуру синтезе од $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, као оптималну, издвојили су и аутори који су синтетисали наночестице злата употребом метанолног екстракта целе биљке *Crocus caspius* (Alizadeh et al., 2023).

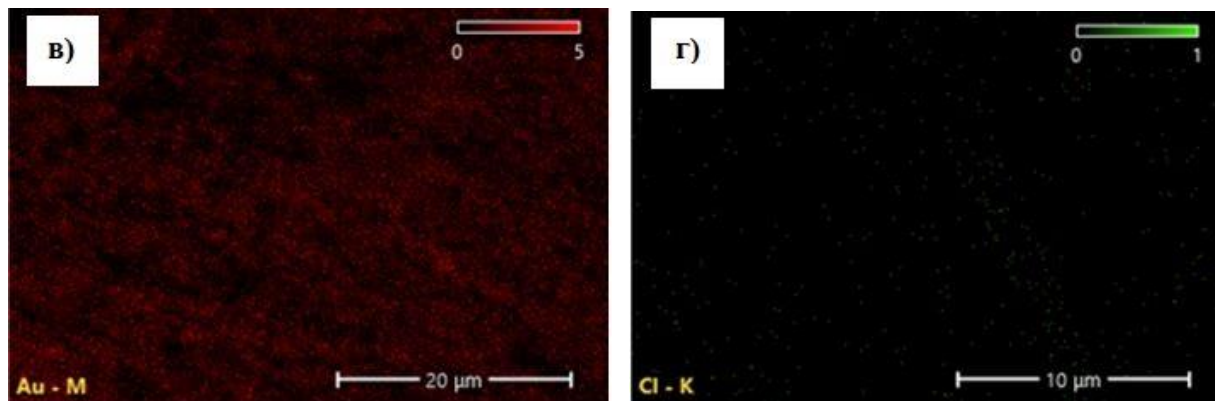
Табела 13. Атомски и масени удео (%) хемијских елемената у суспензијама синтетисаних AuNPs-E

Узорак	Атомски удео, %						Масени удео, %					
	C	N	O	Mg	Cl	Au	C	N	O	Mg	Cl	Au
КМ СТ	40,3	–	36,0	1,9	6,0	15,9	10,9	–	13,0	1,0	4,8	70,3
КМ 80	10,5	5,8	5,5	0,6	2,0	75,6	0,8	0,5	0,6	0,1	0,5	97,5
КР СТ	22,4	3,7	18,8	0,8	2,4	46,8	3,3	0,5	3,0	0,2	0,9	92,1
КР 80	68,6	2,4	10,8	0,5	0,9	16,8	18,8	0,8	3,9	0,3	0,7	75,6

Скраћенице су дате у опису слике 43.

Атоми AuNPs-E побуђени су снопом електрона одређене таласне дужине тако да емитују X-зраке са енергијом специфичном за одређени елемент. Црвено мапирање на слици 45 показује да наночестице састављене од елементарног злата (Hosny and Fawzy, 2021; El-Borady et al., 2021) имају релативно хомогену расподелу и величину у тестираном узорку. Зелена боја у овом случају представља састав хлора који највероватније потиче од коришћене хлороауринске киселине (сл. 45г).

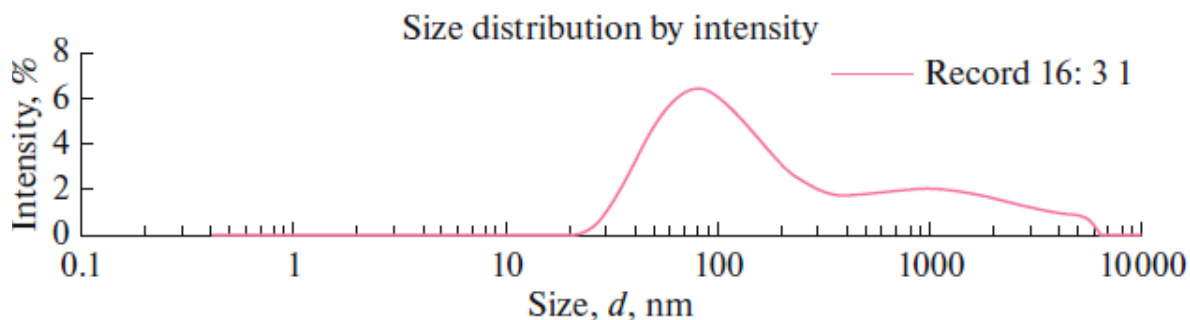




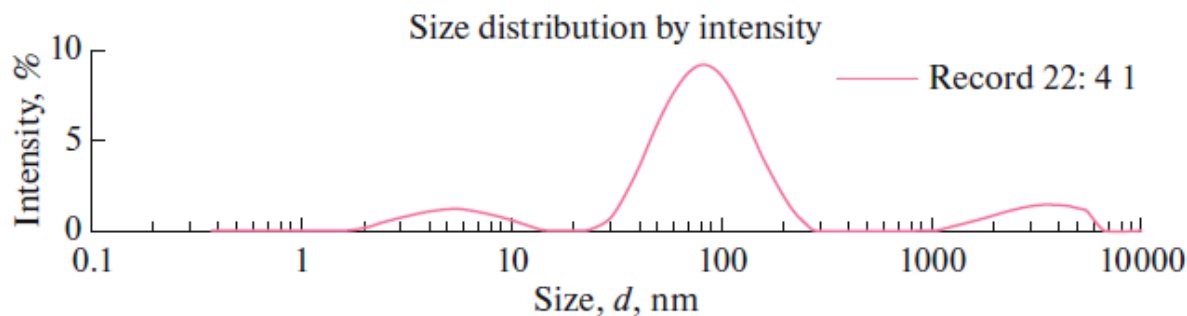
Слика 45. Анализа елементарног мапирања AuNPs-E коришћењем EDX спектроскопије; расподела елементарног злата у AuNPs-E синтетисаних на собној температури (KM CT) (а) и температури $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KM 80) (б) помоћу екстракта добијеног мацерацијом на собној температури; и AuNPs-E синтетисаних на собној температури (KP CT) (в); расподела хлора у AuNPs-E синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KP 80) помоћу екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс (г)

4.2.6 DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица злата

Синтетисане наночестице злата су подвргнуте динамичком расејању светлости за анализу профила, величине и расподеле величине честица у колоидној суспензији. Резултати расподеле хидродинамичких пречника синтетисаних AuNPs-E приказани су на сликама 46 и 47.



Слика 46. DLS анализа AuNPs-E синтетисаних на собној температури помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом (KM CT)



Слика 47. DLS анализа AuNPs-E синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (KP 80)

Пречник, zeta-потенцијал, покретљивост и проводљивост синтетисаних AuNPs-E дати су у табели **14**. Наночестице злата носе углавном негативно наелектрисање на својој површини, што их чини лако модификујућим (Dehghani et al., 2022). Наночестице синтетисане у овом раду показале су негативан zeta-потенцијал са средњом вредношћу $-11,67 \pm 0,45$ и $-17,70 \pm 0,27\text{ mV}$ за КМ СТ и KP 80, респективно (таб. **14**), што указује на чињеницу да су синтетисане наночестице умерено стабилне (Muthuvel et al., 2014; Корерунчолан, 2015). У поређењу са наночестицама сребра, наночестице злата имају мању негативну вредност (Tasić et al., 2024). Негативне вредности zeta-потенцијала заправо описују присуство биоактивних (полифенолних) једињења као стабилизатора или агенаса за затварање. Негативно наелектрисање површине AuNPs-E доводи до правилног „затварања“, тј. формирања и раста AuNPs-E, појачаног електростатичког одбијања између честица, као и стерних ефеката којима се обезбеђује њихова стабилизација (El-Borady et al., 2020; Dehghani et al., 2022).

Табела 14. Пречник, zeta-потенцијал, покретљивост и проводљивост синтетисаних AuNPs-E

Узорак	Z-потенцијал, [mV]	Мобилност, [$\mu\text{mcm/Vs}$]	Проводљивост, [mS/cm]	Величина честица, d [nm]
КМ СТ	-11,7	-0,9184	0,0877	95,15
	-11,2	-0,8754	0,0877	94,32
	-12,1	-0,9500	0,0884	92,45
KP 80	-17,6	-1,382	0,0954	57,22
	-17,5	-1,372	0,0960	52,85
	-18,0	-1,413	0,0979	74,58

Скраћенице су дате у опису слика **46** и **47**.

Имајући у виду да био-синтеза даје полидисперзне честице, може се закључити да синтетисане AuNPs-E показују расподелу величине (сл. **46** и **47**) прилично упоредиву са резултатима добијеним од стране Sujitha и Kannan (2013) и Cudalbeanu и сарадника



(2021). Sujitha и Kannan су употребили екстракт лимуна (*Citrus limon*), мандарине (*Citrus reticulata*) и поморанџе (*Citrus sinensis*) као редукционе агенсе у синтези наночестица злата у различитим концентрацијама. Просечне величине честица које су добили биле су 32,2 nm, 43,4 nm и 56,7 nm за *Citrus limon*, *Citrus reticulata* и *Citrus sinensis*, редом. С друге стране, Cudalbeanu и сарадници (2021) су извршили синтезу AuNPs-E уз помоћ воденог екстракта корена белог локвања (*Nymphaea alba*) уз различиту концентрацију раствора хлороауринске киселине и различитим условима синтезе у поређењу са условима у овом раду. Према DLS анализи, AuNPs-E су показале различите хидродинамичке величине, између 32 nm и 280 nm. Дакле, на основу резултата које су добили наведени аутори, може се закључити да хидродинамичка величина честица јако зависи од односа количине злата и стабилизационог агенса (екстракта). Повећање овог односа у корист количине злата доводи до синтезе честица веће хидродинамичке величине. Такође, на величину честица утичу и pH реакције и време соникације тако да краће време сонификације и pH вредности ниже од 7,0 доводе до повећања хидродинамичке величине. Просечна величина честица добијена DLS анализом у овом раду ($93,9 \pm 1,4$ и $61,6 \pm 11,5$ nm за KM CT и KP 80, респективно, таб. 14) је већа у поређењу са оном добијеном XRD анализом ($17,4 \pm 1$ и $15,7 \pm 2$ nm за KM CT и KP 80, респективно). Објашњење овог феномена дато је у поглављу 4.1.6, где се констатује да DLS метода мери честице у својој пуној величини, укључујући и заштитни и стабилизациони слој, за разлику од XRD анализе која мери само метално језгро синтетисаних честица. Наиме, веће димензије наночестица измерене DLS анализом су резултат чињенице да ова величина укључује биоорганска једињења која обавијају језгро AuNP-E. Такође, на величину честица могу утицати електростатичке интеракције и раствору, попут Van der Waals-ових сила. Још један битан фактор који може утицати на величину наночестица јесте техника припреме узорака будући да различите технике дају различите просечне вредности величине (Sujitha and Kannan, 2013).



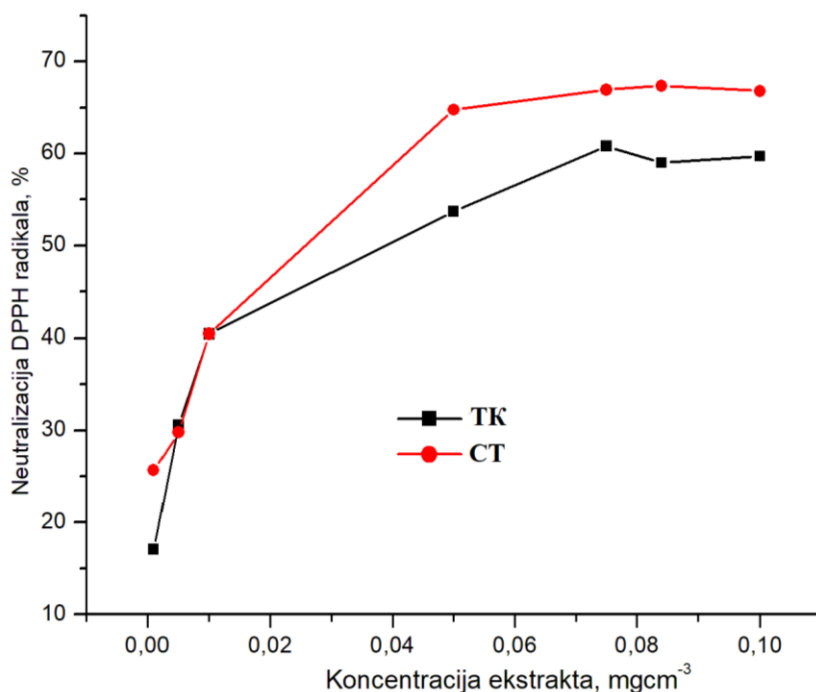
4.3 Биолошка активност синтетисаних наночестица сребра и злата

4.3.1 Антиоксидативна активност

4.3.1.1 DPPH тест наночестица сребра

Постоје два основна механизма којим антиоксиданси неутралишу DPPH радикал (DPPH[•]) – трансфером атома водоника (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) по коме антиоксиданс даје атом водоника DPPH[•] формирајући стабилан DPPH-H комплекс (Bondet et al. 1997; Foti, 2015), или преносом једног електрона (*Single Electron Transfer*, SET) по коме антиоксиданси предају један електрон DPPH[•] стварајући DPPH анион (DPPH⁻) који није радикал сам по себи (Iacopini et al., 2008; Ndhlala et al., 2010; Pouillot et al., 2011). Морућ је и трансфер протона након трансфера електрона (*Electron Transfer and Subsequent Proton Transfer*, SET-PT) у неким случајевима (Marković et al. 2015; Marković, 2016; Shaikh et al. 2019). Различити антиоксиданси делују различитим механизмима на DPPH[•] уз незаборавну чињеницу да понекад није до краја разјашњено којим тачно механизмом неутралишу радикал. У контексту њихове антиоксидативне активности, крајњи исход тј. неутрализација радикала је важна, који год од механизма, или њихова комбинација, да је у питању.

Као што је речено, током реакције неутрализације долази до редукције интензивно љубичастог DPPH радикала у жути хидразин, што се може спектрофотометријски пратити смањењем апсорпције на 517 nm. Упоредни преглед неутрализације DPPH радикала помоћу AgNPs-E синтетисаних на собној температури и температури кључања употребом воденог екстракта јагоде, добијеног мацерацијом на собној температури, приказан је на слици 48.



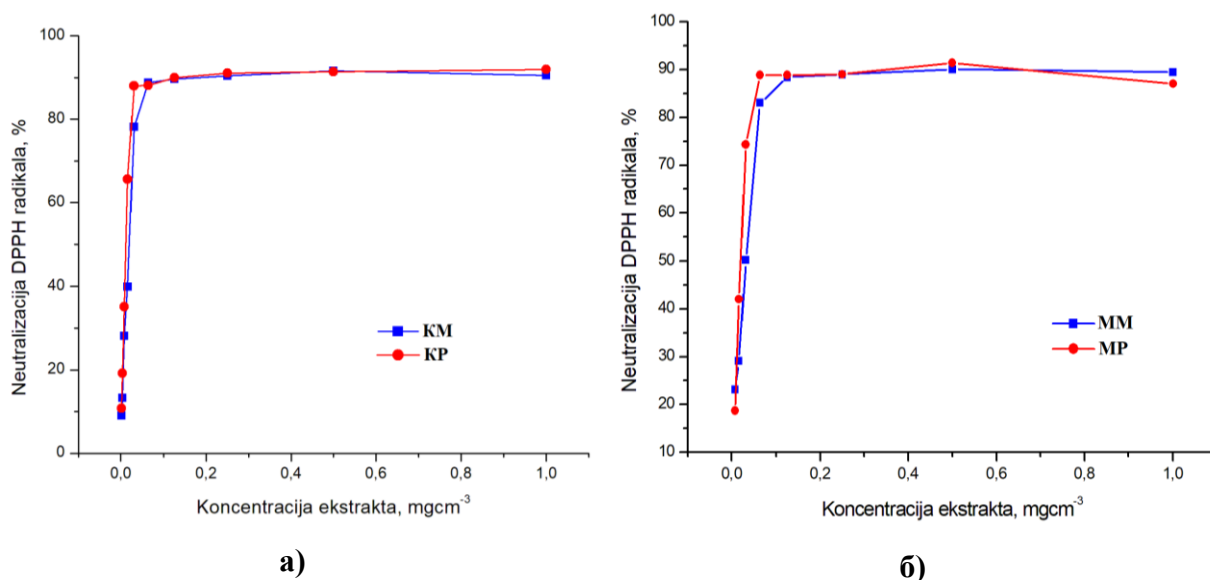
Слика 48. Неутрализација DPPH радикала (%) у функцији концентрације AgNPs-E (mgcm^{-3}) синтетисаних на собној температури (CT) и температури кључања (TK) употребом екстракта листа јагоде добијеног мацерацијом на собној температури

Вредности EC_{50} представљају концентрацију AgNPs-E која је потребна за неутрализацију 50% почетне концентрације DPPH радикала. На основу резултата приказаних на слици 48, може се закључити да суспензије AgNPs-E синтетисане на собној температури имају значајно већу способност да неутралишу DPPH радикал ($\text{EC}_{50} = 0,025 \text{ mgcm}^{-3}$) у поређењу са AgNPs-E синтетисаним на температури кључања ($\text{EC}_{50} = 0,039 \text{ mgcm}^{-3}$) (таб. 15). Са повећањем концентрације узорка изнад $0,01 \text{ mgcm}^{-3}$, разлика у антиоксидативној активности је израженија. Могући разлог оваквог понашања је израженија деструкција молекула антиоксиданса у екстракту током синтезе на температури кључања. Вероватно се ове компоненте у мањој мери разграђују током синтезе на собној температури услед знатно блажих услова реакције. Екстракт листа јагоде коришћен у овој дисертацији показао је бољу антиоксидативну активност ($\text{EC}_{50} = 0,013 \text{ mgcm}^{-3}$) (Cvetković et al., 2017) у поређењу са екстрактима јагоде тестираних од стране других аутора: воденим ($0,487 \text{ mgcm}^{-3}$), метанолним ($0,423 \text{ mgcm}^{-3}$) и етанолним ($0,655 \text{ mgcm}^{-3}$) (Orak et al., 2011), као и етанолним екстрактима три сорте јагоде: *Robus corchorifolius* ($0,053 \text{ mgcm}^{-3}$), *Rubus parvifolius* ($0,046 \text{ mgcm}^{-3}$) и *Duchesnea chrysantha* ($0,067 \text{ mgcm}^{-3}$) (Seleshe et al., 2017). У исто време, екстракт је показао нижу EC_{50} вредност, односно већу активност неутрализације DPPH радикала, у поређењу са суспензијама синтетисаних AgNPs-E (таб. 15). Ови резултати сугеришу да су фенолна

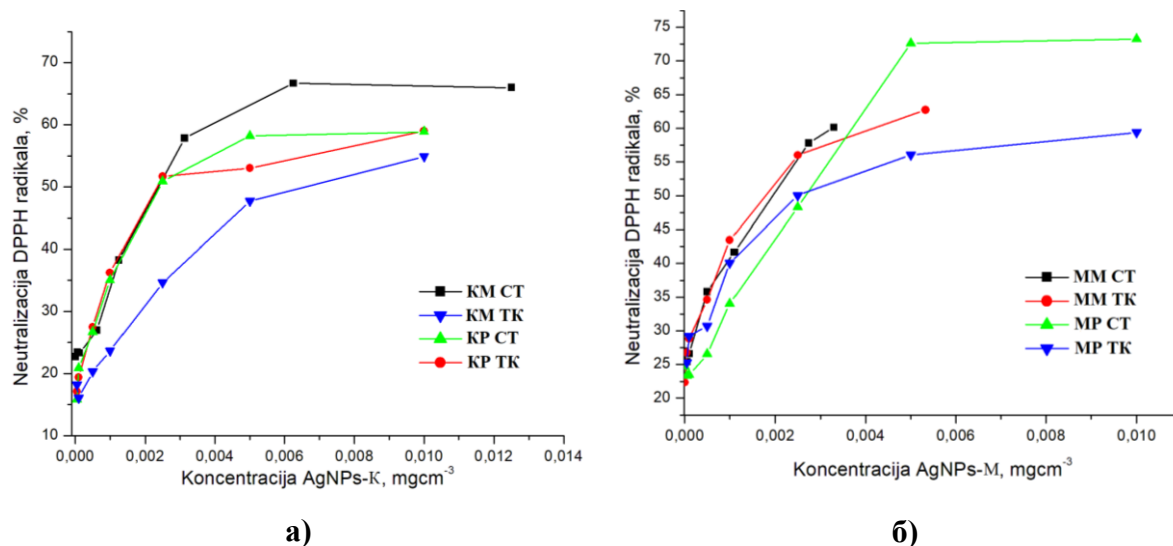


једињења, која су одговорна за антиоксидативну активност, вероватно ангажована у редукцији јона сребра и стабилизацији формираних наночестица преко својих функционалних група тако да су, у извесној мери, „блокирана“ за неутрализацију DPPH радикала, односно антиоксидативну активност. С друге стране, суспензије синтетисаних AgNPs-E показале су веће антиоксидативне активности (ниже вредности EC_{50}) у поређењу са наночестицама синтетисаним коришћењем воденог екстракта листа *Atrocarpus altilis* ($0,051 \text{ mgcm}^{-3}$) (Ravichandran et al., 2016) и *Psidium guajava* ($0,052 \text{ mgcm}^{-3}$) (Wang et al., 2018) као и метанолног екстракта листа *Artemisia vulgaris* ($> 0,2 \text{ mgcm}^{-3}$) (Rasheed et al., 2017).

Упоредни приказ неутрализације DPPH радикала екстрактима купине и малине (добитим мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс, који су коришћени у синтези AgNPs-E) дат је на слици 49, док је упоредни приказ неутрализације DPPH радикала суспензијама AgNPs-E (синтетисаним на собној температури и температури кључања) дат на слици 50. Вредности EC_{50} одређене су из приказаних кривих и дате су у табели 15.



Слика 49. Неутрализација DPPH радикала (%) у функцији од концентрације екстракта добијених из листова купине мацерацијом (KM) и екстракцијом уз рефлукс (KP) (а) и из листова малине мацерацијом (MM) и екстракцијом уз рефлукс (MP) (б)



Слика 50. Неутрализација DPPH радикала (%) у функцији од концентрације AgNPs-E (mgcm^{-3}) стабилованих екстрактима листа купине добијених мацерацијом и синтетисаних на собној температури (KM CT) и температури кључања (KM TK), као и AgNPs-E стабилованих екстрактима листа купине добијених екстракцијом уз рефлукс и синтетисаних на собној температури (KP CT) и температури кључања (KP TK) (а); AgNPs-E стабилованих екстрактима листа малине добијених мацерацијом и синтетисаних на собној температури (MM CT) и температури кључања (MM TK), као и AgNPs-E стабилованих екстрактима листа малине добијених екстракцијом уз рефлукс и синтетисаних на собној температури (MP CT) и температури кључања (MP TK) (б)

Табела 15. EC_{50} вредности екстракта листа јагоде (добијеног мацерацијом на собној температури), екстракта листа малине и листа купине (добијених мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања) и AgNPs-E (синтетисаних на собној температури и температури кључања употребом горе наведених екстраката)

Екстракт		EC ₅₀ вредности [mgcm ⁻³]				
		AgNPs-E				
		Екстракција (техника)				
		Мацерација		Рефлукс		
Мацерација	Рефлукс	Температура синтезе				
		Собна T	T кључања	Собна T	T кључања	
Малина	0,029	0,018	0,0019	0,0018	0,0038	0,0031
Купина	0,020	0,011	0,0024	0,0066	0,0024	0,0023
Јагода	0,013	-	0,0250	0,0390	-	-

Треба приметити да су AgNPs-E синтетисане са екстрактом јагоде показале за ред величине слабију антиоксидативну активност у поређењу са оним синтетисаним употребом екстракта малине и купине (таб. 15). Овај резултат је био један од критеријума за одабир AgNPs-E као основе за припрему формулација у даљем раду, у циљу редукције броја узорака и у складу са ресурсима који су били на располагању. Највећу антиоксидативну активност ($\text{EC}_{50} = 0,0018 \text{ mgcm}^{-3}$) показале су AgNPs-E

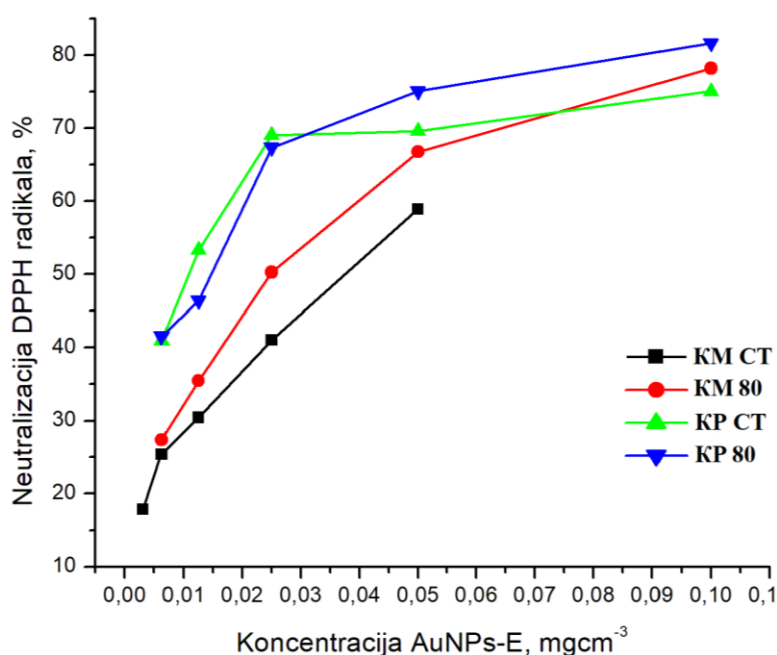


синтетисане на температури кључања из екстракта листа малине добијеног мацерацијом на собној температури. Може се приметити да су сами екстракти добијени екстракцијом уз рефлукс показали већу активност у односу на екстракте добијене мацерацијом, што указује на ефикаснију екстракцију активних једињења екстракцијом уз рефлукс. Такође, може се приметити да је екстракт купине имао већу антиоксидативну активност од екстракта малине, док је екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс показао највећу антиоксидативну активност ($EC_{50} = 0,011 \text{ mgcm}^{-3}$). Сви анализирани екстракти, добијени различитим техникама екстракције, показали су антиоксидативну активност сличну оној која је већ уочена код других биљних екстраката (Stanojević et al., 2013; Cvetković et al., 2017; Stanojević et al., 2016). Може се приметити да су синтетисане AgNPs-E показале приближно десет пута већу антиоксидативну активност од чистих екстраката (таб. 15). Са друге стране, AgNPs-E синтетисане при температури кључања из екстракта малине добијеног мацерацијом показале су највећу антиоксидативну активност са $EC_{50} = 0,018 \text{ mgcm}^{-3}$. Антиоксидативна активност AgNPs-E, синтетисаних екстрактима малине и купине, показује значајну неконзистентност кад су у питању техника екстракције и услови синтезе (таб. 15). Наиме, екстракти добијени мацерацијом листа малине продуковали су активније честице, за разлику од листа купине где су екстракти добијени уз рефлукс дали ефикасније честице. Овако неконзистентни резултати допринели су одлуци да се у даљим тестовима користе обе биљке, као и технике екстракције и синтезе. AgNPs-E синтетисане горе описаним поступком показале су већу способност неутрализације DPPH радикала у поређењу са резултатима за AgNPs синтетисане екстрактом биљке *Tinctoria* (Vijayan et al., 2018). Поред тога, наночестице синтетисане екстрактом из листа купине и малине показале су ниже вредности EC_{50} од AgNPs добијених из воденог екстракта листа *Iresine herbstii* (Dipankar et al., 2012), *Ganoderma applanatum* (Jogaiah et al., 2018) и листова *Artemisia vulgaris* (Rasheed et al., 2017). Имајући у виду добијене резултате антиоксидативне активности, као и стабилност наночестица сребра праћену методом UV-Vis спектроскопије, у даљим истраживањима је дата предност наночестицама стабилизованим воденим екстрактима листа купине (мацератом и екстрактом добијеним екстракцијом уз рефлукс). Ове наночестице су коришћене као активне компоненте у формулацији козметичких производа, типа хидрогела као финалног производа пројектованог у оквиру циљева ове дисертације. На основу резултата самог DPPH теста несумњиво остаје отворено поље синтезе хидрогелова са наночестицама сребра синтетисаним употребом екстраката из листа малине.



4.3.1.2 DPPH тест наночестица злата

Држећи се горе наведеног критеријума, антиоксидативна активност наночестица злата, синтетисаних употребом воденог екстракта из листа купине, је такође проверена DPPH тестом. Упоредни приказ неутрализације DPPH радикала суспензијом AuNPs-E, синтетисаних на собној температури и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, дат је на слици 51. Као што се може приметити, способност неутрализације DPPH радикала од стране синтетисаних AuNPs-E зависи од концентрације честица код свих узорака.



Слика 51. Неутрализација DPPH радикала (%) у функцији од концентрације AuNPs-E (mgcm^{-3}) стабилованих помоћу екстракта листа купине добијеног мацерацијом, синтетисаних на собној температури (KM CT) и на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KM 80), као и AuNPs-E стабилованих помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс, синтетисаних на собној температури (KP CT) и на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KP 80)

Вредности EC_{50} које, као што је горе речено, представљају концентрацију AuNPs-E потребну за неутрализацију 50% од почетне концентрације DPPH радикала, дате су у табели 16.

Табела 16. EC_{50} вредности (mgcm^{-3}) екстраката листа купине добијених мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, као и суспензија AuNPs-E синтетисаних на собној температури и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ употребом наведених екстраката



EC ₅₀ [mgcm ⁻³]			
AuNPs-E			
Екстракција (техника)			
Мацерација		Рефлукс	
0,02		0,011	
Температура синтезе			
Собна <i>T</i>	<i>T</i> = 80°C	Собна <i>T</i>	<i>T</i> = 80°C
0,0375	0,0247	0,0108	0,0146

Имајући у виду да мање EC₅₀ вредности одражавају бољу антиоксидативну активност може се закључити да су AuNPs-E, синтетисане на собној температури и стабилизоване екстрактом листа купине добијеним екстракцијом уз рефлукс, показале највећу антиоксидативну активност (таб. 16). Екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс показао је већу антиоксидативну активност (EC₅₀ = 0,0110 mgcm⁻³) у поређењу са мацератом (EC₅₀ = 0,020 mgcm⁻³) (Stevanović et al., 2019). У исто време, AuNPs-E синтетисане коришћењем екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс показале су већу антиоксидативну активност (EC₅₀ = 0,0108 и 0,0146 mgcm⁻³, синтетисане на собној *T* и *T* = 80 °C, респективно) у поређењу са синтетисаним коришћењем екстракта добијеног мацерацијом (EC₅₀ = 0,0375 и 0,0247 mgcm⁻³, синтетисане на собној *T* и *T* = 80 °C, респективно), што сугерише да је екстракција уз рефлукс ефикаснија у смислу изолације биоактивних једињења и синтезе ефикаснијих AuNPs-E. Сличан закључак уочен је и код наночестица сребра, што додатно потврђује значај избора екстракционе методе у процесу „зелене“ синтезе наночестица. Такође, треба приметити да су AuNPs-E синтетисане помоћу екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс показале сличну антиоксидативну активност као и сам екстракт, што није толико очигледно у случају AuNPs-E синтетисаних мацератом добијеним на собној температури (таб. 16). Могуће је да су функционалне групе фитохемикалија из мацерата у већој мери блокиране у редукцији Au јона него оне у екстракту добијеним рефлукс екстракцијом, односно да је екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс богатији фитохемикалијама, што се и очекује имајући у виду већу ефикасност екстракције уз рефлукс.

У поређењу са резултатима добијеним са наночестицама сребра, стабилованим истим екстрактом и под сличним експерименталним условима, може се закључити да су AgNPs-E показале већу антиоксидативну активност у свим упоредивим случајевима (таб. 15 и 16). Могуће објашњење такве активности може бити у облику формираних



наночестица. Наиме, AgNPs су обично израженијег сферног облика, па самим тим имају и већу површину, што омогућава већу антиоксидативну активност у поређењу са AuNPs. Овај закључак се може поткрепити чињеницом да су добијене наночестице истражене у циљу одређивања облика и величине, при чему је ТЕМ анализом установљено да су AgNPs високо стабилизоване, сферног облика и са глатком површином. За разлику од њих, AuNPs су различите морфологије (сферне, тругласте и хексагоналне), па је самим тим и контактна површина ових честица вероватно умањена (Vijayan et al., 2018; Soliman et al., 2023). Друго објашњење може бити различита способност губитка електрона између Ag и Au (Francis et al., 2018). Већа антиоксидативна активност AgNPs у односу на AuNPs може бити и последица деловања сребра као релативно бољег редукционог агенса и његове могућности лакшег губитка електрона (Ramamurthy et al., 2013).

Синтетисане AuNPs-Е показале су значајно већу способност да неутралишу слободне DPPH радикале у поређењу са активношћу AuNPs синтетисаних воденим екстрактом семена манга (*Mangifera indica*) са $EC_{50} = 0,256 \text{ mgcm}^{-3}$ (Donga et al., 2020), воденим екстрактом плода *Hoveniadelphicis* са $EC_{50} \approx 0,2 \text{ mgcm}^{-3}$ (Basavegowda et al., 2014), или воденим екстрактом листова *Solanum nigrum* са $EC_{50} \approx 0,1 \text{ mgcm}^{-3}$ (Muthuvel et al., 2014). Већа антиоксидативна активност AuNPs-Е синтетисаних у овом раду је вероватно последица значајног садржаја фенолних једињења у екстракту листова купине који је доказан UHPLC–MS хроматографијом (Stevanović et al., 2019).

4.3.2 Антимикробна активност

4.3.2.1 Антимикробна активност наночестица сребра

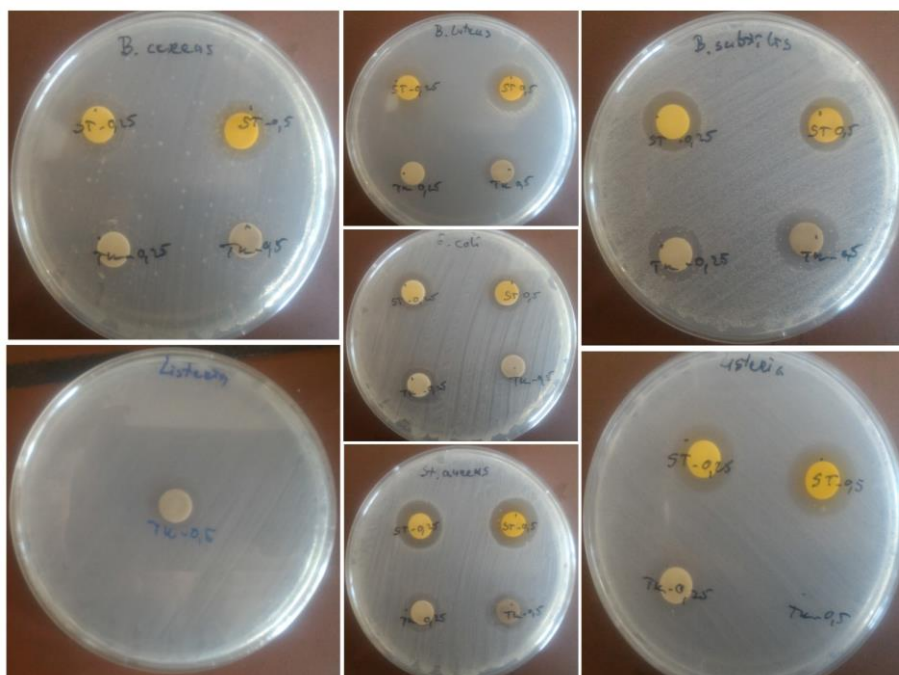
У оквиру дефинисања биолошке активности екстраката и синтетисаних наночестица вршена је и провера антимикробне активности различитим методама против *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus luteus* и *Candida albicans* ATCC 2091. Проверене су активности наночестица које су стабилизоване екстрактима јагоде, малине и купине, диск дифузионом или микродилуционом методом, против микроорганизама узгајаних у лабораторијама Технолошког факултета у Лесковцу.



Пречници зона инхибиције раста микроорганизама, у присуству AgNPs-Е синтетисаних екстрактом листа јагоде добијеним мацерацијом на собној температури, дати су у табели 17. Репрезентативне фотографије агар плоча приказане су на слици 52. Инхибиција раста није примећена код бактерије *B. Cereus* и Gram-негативних бактерија.

Табела 17. Антибактеријска активност суспензије AgNPs-Е синтетисаних помоћу екстракта листа јагоде на собној температури и температури кључања. Екстракт листа јагоде добијен мацерацијом на собној температури

	Температура AgNPs-Е синтезе:			
	Собна температура		Температура кључања	
	Концентрација AgNPs, mgcm ⁻³			
	0,25	0,5	0,25	0,5
Бактеријски сојеви	Просечан пречник зоне инхибиције ± SD, mm			
Gram позитивне бактерије				
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-
<i>B. luteus</i>	15,3±0,577	18,3±0,577	12,7±0,577	14,0±0,000
<i>B. subtilis</i>	15,8±0,577	14,5±0,551	15,2±0,577	16,7±0.608
<i>L. monocytogenes</i>	17,3±0,577	18,5±0,500	12,3±0,577	15,7±1.155
<i>S. aureus</i>	17,3±0,577	17,8±0,764	13,3±0,577	15,0±0,000
Gram негативне бактерије				
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	14,3±0,577	14,3±0,577	12,7±0.577	12,0±0,000



Слика 52. Фотографије агар плоча као илустрација антимикробне активности AgNPs-Е синтетисаних на собној температури и температури кључања, употребом екстракта



листа јагоде добијеним мацерацијом на собној температури, у односу на бактеријске сојеве *B. Cereas*, *B. Luteus*, *B. Subtilis*, *E. Coli*, *L. monocytogenes*, *St. Aureus*

У оквиру антимикуробне анализе наночестица сребра, стабилованих воденим екстрактом јагоде, утврђено је да повећање концентрације узорка није довело до значајног пораста антимикуробне активности с обзиром на то да су зоне инхибиције остале приближно исте (таб. 17). Антибактеријска активност AgNPs-E тестирана је против пет сојева Gram-позитивних и четири соја Gram-негативних бактерија. Активност AgNPs-E против Gram-позитивних бактерија значајно је већа у односу на активност против Gram-негативних бактерија. Међу анализираним Gram-негативним бактеријама, наночестице сребра биле су активне само против *E. coli*. Антибактеријска активност против *E. coli* је већ потврђена за AgNPs стабиловане екстрактима из *Alternanthera dentate* (Kumar et al., 2014), листова чаја (Nabikhan et al., 2010), *Mentha piperita* (Gabriela et al., 2017) и *Aloe vera* (Zhang et al., 2010). Највећа активност AgNPs-E примећена је против *L. monocytogenes* и *S. aureus*. У поређењу са чистим екстрактом, синтетисане AgNPs-E имају шири спектар антибактеријске активности будући да је чисти екстракт показао активност само против *E. coli*, *S. aureus* и *P. vulgaris* (Stanojević et al., 2016). Такође, синтетисане AgNPs-E показале су већу антибактеријску активност у поређењу са AgNPs стабилованим карбоксиметил декстраном и тестираним у истим концентрацијама (Glišić et al., 2015). Може се приметити да AgNPs-E, синтетисане у различитим концентрацијама на собној температури, имају приближно исту активност што имплицира слична величина зона инхибиције (таб. 17). Поред тога, суспензије AgNPs-E синтетисане на собној температури показале су нешто већу антибактеријску активност у поређењу са онима синтетисаним на температури кључања (таб. 17), што је у складу са резултатима Nagajyothis и Lee (Nagajyothi and Lee, 2011). Антибактеријски ефекат сребра заснива се на неколико механизма, укључујући ослобађање јона сребра са површине наночестица, оштећење ћелијске мембране, поремећај транспорта електрона, инхибицију синтезе DNK и оксидативни стрес. Услед оксидације, на површини наночестица се формира оксид сребра (Ag_2O), који у реакцији са протонима из околне средине формира слободне Ag^+ јоне (Xiu et al., 2011). Јони сребра се електростатичком интеракцијом везују за ћелијску мембрану бактерије повећавајући њену пропустљивост, што узрокује уништење мембране. Такође, продор јона унутар ћелије доводи до ћелијских поремећаја, немогућности репликације и коначно смрти (Li et al., 2011; Barani et al., 2012; Gutierrez et al., 2012). Механизам антибактеријске



активности синтетисаних AgNPs-E вероватно укључује формирање малих отвора у ћелијској мембрани што доводи до њеног уништења (Shrivastava et al., 2007; Tamboli and Lee, 2013). Не може се занемарити ни ефекат сребра на ензими или синтезу протеина у ћелијама микроорганизама, што узрокује поремећај њиховог метаболизма (Feng et al., 2000; Klaine et al., 2008). Може се претпоставити да је антибактеријска активност резултат истовременог деловања AgNP и фенолних једињења пореклом из биљног екстракта, што подржава приступ процесу зелене синтезе и коришћење различитих биљака за редукцију и стабилизацију AgNP.

Антимикробна активност екстракта из листа малине и купине, као и AgNPs-E синтетисаних овим екстрактима на собној температури и температури кључања, тестирана је на Gram-позитивне и Gram-негативне бактерије одређивањем минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне бактеријске концентрације (MBC). Резултати су приказани у табели 18.

Табела 18. Антимикробна активност екстракта листа малине добијених мацерацијом (ММ) и екстракцијом уз рефлукс (МР) и AgNPs-E синтетисаних на собној температури (ММ СТ и МР СТ) и температури кључања (ММ ТК и МР ТК) употребом ових екстракта; екстракта листа купине добијених мацерацијом (КМ) и екстракцијом уз рефлукс (КР) и AgNPs-E синтетисаних на собној температури (КМ СТ и КР СТ) и температури кључања (КМ ТК и КР ТК) употребом ових екстракта

Концентрација AgNPs-E, mgcm ⁻³							
Малина							
		Екстракти		AgNPs-E			
Микроорганизми		ММ	МР	ММ СТ	МР СТ	ММ ТК	МР ТК
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	MIC	>3,900	2,300	0,070	0,035	0,020	0,030
	MBC	/	3,900	0,070	0,070	0,080	0,060
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MIC	1,950	0,383	0,035	0,035	0,020	0,015
	MBC	1,950	2,300	0,070	0,070	0,080	0,060
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	MIC	>3,900	0,767	0,035	0,035	0,010	0,015
	MBC	/	4,600	0,070	0,070	0,080	0,060
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	MIC	0,975	0,384	0,035	0,035	0,010	0,015
	MBC	0,975	3,900	0,070	0,070	0,020	0,030
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MIC	>3,900	2,300	0,070	0,035	0,020	0,015
	MBC	/	4,600	0,070	0,070	0,080	0,060
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	MIC	0,488	0,383	0,017	0,002	0,005	0,015
	MFC	1,950	3,900	0,017	0,070	0,080	0,030
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	MIC	>3,900	2,300	0,070	0,035	0,020	0,060
	MBC	/	3,900	0,070	0,070	0,080	0,060
Купина							
		КМ	КР	КМ СТ	КР СТ	КМ ТК	КР ТК
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	MIC	1,700	1,034	0,055	0,045	0,045	0,022
	MBC	6,800	8,275	0,110	0,090	0,090	0,045
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	0,850	1,034	0,055	0,045	0,022	0,022



ATCC 25923	MBC	6,800	4,137	0,110	0,090	0,090	0,090
<i>Proteus vulgaris</i>	MIC	1,700	4,137	0,055	0,022	0,022	0,022
ATCC 8427	MBC	6,800	8,275	0,110	0,090	0,090	0,090
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	0,850	1,091	0,055	0,045	0,045	0,022
ATCC 27853	MBC	6,800	8,275	0,110	0,090	0,090	0,045
<i>Escherichia coli</i>	MIC	3,400	4,137	0,055	0,045	0,045	0,045
ATCC 25922	MBC	6,800	8,275	0,110	0,090	0,090	0,090
<i>Candida albicans</i>	MIC	0,212	0,517	0,007	0,011	0,022	0,011
ATCC 2091	MFC	3,400	1,034	0,007	0,090	0,045	0,045
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MIC	3,400	4,137	0,055	0,045	0,090	0,045
ATCC 700603	MBC	6,800	8,275	0,110	0,090	0,090	0,090

Антимикробна активност екстракта малине и купине, као и AgNPs-E синетисаних овим екстрактима, тестирана је против две Gram-позитивне, четири Gram-негативне бактерије и једне гљивице (таб. 18). AgNPs-E су генерално показале већу антимикробну активност у поређењу са екстрактима. Највећу антимикробну активност показале су AgNPs-E синтетисане на температури кључања помоћу екстракта купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (КР ТК), чија је почетна концентрација била најнижа, док је најбољу активност показао екстракт купине добијен мацерацијом (КМ). *C. albicans* је показала највећу осетљивост приликом тестирања овог узорка. Узорак екстракта добијен из листа малине показао је релативно слабу антимикробну активност, што је потврђено веома високим вредностима MIC и MBC параметара (таб. 18). Може се закључити да екстракти сами по себи не постижу релативно висок бактерицидни ефекат у тестираним концентрацијама. Добијени резултати такође указују на значајно већу антимикробну активност екстракта добијених из листова купине, што је послужило као основ за одабир овог узорка у даљим истраживањима.

Насупрот томе, AgNPs-E показују значајно побољшану антимикробну активност, што се огледа у знатно нижим вредностима MIC и MBC/MFC параметара у односу на саме екстракте. AgNPs-E синтетисане употребом биљних екстракта показују антимикробну активност против свих испитиваних микроорганизама, укључујући и гљивицу *C. albicans*.

Поређењем резултата за малину и купину из табеле 18, може се закључити да екстракти добијени из листа купине испољавају бољу инхибиторну активност у односу на екстракте малине. С друге стране, AgNPs-E синтетисане екстрактима обеју биљних врста показују значајну антимикробну активност, при чему наночестице синтетисане екстрактима купине достижу најнижу измерену вредност MIC (0.0069 mgcm^{-3}). Такође, услови синтезе имају значајан утицај на крајњу биолошку активност, при чему



наночестице синтетисане на повишеној температури (температура кључања) показују бољу антимикуробну ефикасност, што сугерише да овакви услови погодују формирању стабилнијих и активнијих наноструктура.

Ови резултати су у складу са резултатима које су добили Paosen и сарадници (2017) при испитивању осетљивости *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* на примену AgNPs-E стабилизаних екстрактима листова *Callistemon lanceolatus*, *Decaspermum lanceolata*, *Decaspermum Mellayutriflorum*, *Rus tomentosa*, *Syzygyupam campanulatum* и *Xanthostemon chrysanthus*. Loo и сарадници (2018) су такође тестирали осетљивост *K. pneumoniae* и *E. coli* на AgNPs-E стабилизаних екстрактима листова пуер чаја, где је *K. pneumoniae* показала већу осетљивост на основу MIC и MBC тестова. Аутори су и овде закључили да се синтетисане AgNPs могу акумулирати на ћелијском зиду и мембрани, што доводи до морфолошких промена (Tamboli and Lee, 2013; Shrivastava et al., 2007), односно нарушавања ћелијског метаболизма усред дејства сребра на ензиме или синтезу протеина (Klaine et al., 2008; Feng et al., 2000). Антибактеријска активност је процес у коме се ослобађају јони сребра настали оксидативним растварањем AgNPs у присуству кисеоника (Quay and Stellacci, 2015). Јони сребра ометају поделу и репродукцију ћелија успостављањем веза са широким спектром биомолекула. Величина наночестица сребра је такође важан фактор за антибактеријску активност (Liaqat et al., 2022). Неки истраживачи су открили да мање честице AgNPs показују већу антибактеријску активност против *E. coli*, са просечном величином од 15 nm (Lok et al., 2007; Tang and Zheng, 2018). Већи однос површине према запремини честица даје ефикаснију интеракцију са бактеријама, тако да честице мањих величина боље продиру у ћелије микроорганизама и доводе до њихове деструкције. Синтеза AgNPs са биљним екстрактима управо доводи до повећања односа површине и запремине (тј. синтезе мањих честица), што додатно пружа могућности за интеракције између биљних екстраката и тестираних бактерија. Ово су вероватно разлози који омогућавају ефикасно антимикуробно дејство AgNPs при релативно ниским концентрацијама наночестица (Hanafiah et al., 2023). Резултати презентовани у овом раду дају јаку основу за развој фармацеутско-козметичких формулација на бази AgNPs-E са значајним антимикуробним потенцијалом, пре свега антифунгалним против *C. albicans*.

4.3.2.2 Антимикробна активност наночестица злата

Антимикробна активност AuNPs-E синтетисаних на собној температури и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, употребом екстраката из листа купине, тестирана је на Gram-позитивне и Gram-



негативне бактерије и једну гљивицу диск-дифузионом методом која се показала адекватнијом у тестирању наночестица злата, а резултати су приказани у табели **19** као пречници зона инхибиције. Екстракти су добијени мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања.

Табела 19. Антимикробна активност суспензије AuNPs-E стабилованих на собној температури и $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ помоћу екстракта листа купине добијених мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс

Бактеријски сојеви	Пречник зоне инхибиције, (cm)				
	Техника екстракције				Amoxicillin + clavulanic acid 20/10µg
	Мацерација		Рефлукс екстракција		
	Температура синтезе AuNPs:				
	Собна T	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$	Собна T	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$	
Gram позитивне					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	$1,37 \pm 0,11$	$2,67 \pm 0,15$
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	–	–	–	$1,10 \pm 0,10$	$3,10 \pm 0,10$
Gram негативне					
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8427	–	–	–	–	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	–	–	–	–	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$1,10 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,23 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,00$	$2,53 \pm 0,06$
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	–	–	–	–	

Из табеле **19** се може приметити да се *P. aeruginosa* показао као једини бактеријски сој осетљив на све синтетисане AuNPs-E, док су само наночестице синтетисане на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, из екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс, показале активност против обе тестиране Gram-позитивне бактерије. Активност анализираних честица била је приметно слабија у поређењу са антибиотиком који је коришћен као позитивна контрола. Као што је горе напоменуто, AgNPs-E синтетисане на собној температури и температури кључања, и стабиловане мацератом култивисаних листова јагоде (Stevanović et al., 2021), показао је активност и против Gram-позитивних бактерија. Посматрајући Gram-негативне бактерије, AgNPs-E и AuNPs-E треба сматрати комплементарним у односу на *E. coli* и *P. aeruginosa*, пошто су AgNPs-E показале активност против *E. coli* (таб. 17, Stevanović et al., 2021), док су све синтетисане AuNPs-E показале активност против *P. aeruginosa* (таб. 19). Антибактеријску активност AuNPs, синтетисаних „зеленим“ методама, против *S. aureus* и *P. aeruginosa* доказали су Bindahu и Umadevi (2014), закључујући да различита активност против коришћених бактерија



вероватно зависи од њихове ћелијске структуре, физиологије, метаболизма и интеракције са наелектрисаним AuNPs. Cui и сарадници (2012) су предложили два начина којим AuNPs испољавају своје антибактеријско дејство: један је промена мембранског потенцијала и инхибиција АТР синтезе, чиме укупни метаболизам страда, а други је уништење рибозома, што доводи до колапса биолошког процеса (Cui et al., 2012). Имајући у виду да антимикуробни механизми наночестица још нису у потпуности разјашњени (Cui et al., 2012), а укључују поремећај мембрана, оксидацију протеина, оштећење митохондрија и DNK, итд. (Klaine et al., 2008; Sathiyaraj et al., 2021; Suriyakala et al., 2022), разлике у антибактеријској активности могу се објаснити и чињеницом да Gram-позитивне и Gram-негативне бактерије имају различиту чврстину ћелијских зидова, што опет диктира различите механизме везане за улазак наночестица унутар ћелија и уништење бактерија (Reddy et al., 2015; Suriyakala et al., 2022). Поред тога, као што је већ напоменуто, изгледа да су величина честица, односно велики однос површине и запремине, и једноставна морфологија, веома важни за њихову антибактеријску ефикасност будући да им прилично мале димензије омогућавају лако продирање и уништење бактерије (Suriyakala et al., 2022). Пошто не постоји једнообразно и доследно објашњење механизма антимикуробног деловања наночестица метала, предложени су комбиновани ефекти физичких и оксидативних механизма који доводе до деструкције ћелија: везивање AuNPs са липополисахаридима и протеинима на површини ћелије и деструкцију ћелијске мембране; деструкција ћелијске мембране даље води до повећане пропустљивости и страдања ћелија и стварања интрацелуларних реактивних кисеоничних врста (ROS) које уништавају антиоксидативни одбрамбени систем ћелија (Khan et al., 2020). На основу приказаних резултата и изведених закључака, требало би предложити истовремену употребу AgNPs-E и AuNPs-E у фармацеутско-козметичким формулацијама ради ефикаснијег деловања на Gram-негативне бактерије.

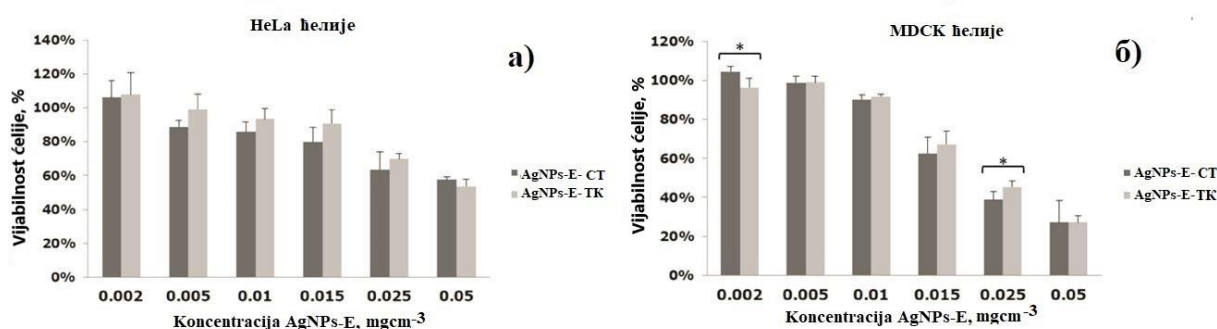
4.3.3 Цитотоксична активност наночестица сребра *in vitro*

Разматрајући тестове вијабилности (одрживости, способности за живот), који зависе од конверзије супстрата у хромогени производ од стране живих ћелија, МТТ тест је несумњиво један од најсвестранијих и најпопуларнијих. МТТ тест подразумева конверзију водорастворљиве жуте боје МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-



дифенилтетразолијум бромид] у нерастворљиви љубичасти формазан дејством митохондријалне сукцинат дехидрогеназе у митохондријама живих ћелија. Као и код alamarBlue теста, мале промене у метаболичкој активности могу генерисати велике промене у МТТ, што омогућава детекцију стреса након излагања токсичном агенсу без директне смрти ћелије. Редукција МТТ се дешава само у метаболички активним ћелијама, а ниво активности представља меру одрживости ћелија. МТТ је осетљив тест са одличном линеарношћу до $\sim 10^6$ ћелија по једном бунарићу у плочи. Органски растварач, обично диметил сулфоксид, користи се за растварање нерастворљивог кристала формазана, производа љубичасте боје, а концентрација му се одређује мерењем апсорбанце на 570 nm. Количина произведеног формазана је директно пропорционална броју одрживих ћелија присутних у узорку (Patravale et al., 2012; Kumar et al., 2018).

Ефекти различитих концентрација AgNPs-E, синтетисаних на собној температури и температури кључања са екстрактом листа јагоде, на вијабилност две најчешће коришћене ћелијске линије налик епителу (HeLa и MDCK) оцењени су МТТ тестом (Stevanović et al., 2021). Примећена је зависност активности од концентрације за обе тестиране суспензије AgNPs-E у обе ћелијске линије (сл. 53). Уочена је цитотоксичност при вишим испитиваним концентрацијама ($0,025$ и $0,05 \text{ mg cm}^{-3}$) на обе ћелијске линије, израженија на MDCK у поређењу са HeLa ћелијама.



Слика 53. Вијабилност HeLa ћелија (а) и MDCK ћелија (б) након 24 h инкубације са растворима AgNPs-E синтетисаним на собној температури (AgNPs-E-CT) и температури кључања (AgNPs-E-TK), процењена МТТ тестом (*) $p < 0,05$. За синтезу и стабилизацију наночестица коришћен је екстракт листа јагоде добијен мацерацијом на собној температури

Када је у питању ефекат суспензија AgNPs-E, синтетисаних на собној температури и температури кључања, на виталност HeLa ћелија, нису примећене статистички значајне разлике при било којој од испитиваних концентрација (сл. 53). Међутим, када су ефекти



AgNPs-E суспензија испитивани на MDCK ћелије, уочена је статистички значајна разлика у ефекту на вијабилност ћелија при две испитиване концентрације од $0,002 \text{ mgcm}^{-3}$ и $0,025 \text{ mgcm}^{-3}$ (сл. 53). При концентрацији наночестица од $0,002 \text{ mgcm}^{-3}$ AgNPs-E-TK показују јачи ефекат, док је при концентрацији од $0,025 \text{ mgcm}^{-3}$ обрнуто, AgNPs-E-CT су показале јачи ефекат на MDCK ћелије. Ово сугерише да начин синтезе може утицати на активност наночестица, али при одређеним концентрацијама. Уочене су значајне разлике у ефектима при вишим испитиваним концентрацијама суспензија AgNPs-E-CT и AgNPs-E-TK (од $0,015$ до $0,05 \text{ mgcm}^{-3}$) на вијабилност HeLa и MDCK ћелија. Израженија цитотоксичност (смањена вијабилност ћелија), која је примећена при концентрацијама у распону од $0,015 \text{ mgcm}^{-3}$ до $0,05 \text{ mgcm}^{-3}$ за AgNPs-E-CT и AgNPs-E-TK на MDCK ћелијама, у поређењу са HeLa ћелијама, може се објаснити разликама између те две ћелијске линије у смислу њиховог порекла, ћелијских карактеристика и специфичних функција које оне поседују. Овај резултат доводи до закључка да су MDCK ћелије осетљивије на наночестице сребра од HeLa ћелија. Приказани резултати су упоредиви са резултатима других истраживача (Mubarak et al., 2011; Nerokur et al., 2019) који сугеришу да AgNPs синтетисане употребом екстракта листа јагоде показују потенцијал као састојак козметичких препарата за лечење различитих стања коже (Parveena et al., 2018; Prociak et al., 2019).

На основу презентованих резултата, може се закључити да AgNPs-E показују концентрациону зависност на HeLa и MDCK ћелијским линијама и ефекат на вијабилност ћелија који је специфичан за ћелијску линију, што је процењено МТТ тестом. Добијени резултати показују да се наночестице сребра синтетисане у овом раду могу користити као сировина у производњи фармацеутских препарата за потенцијалну примену на кожи, али у дефинисаним и безбедним концентрацијама (нижим од $0,015 \text{ mgcm}^{-3}$).

4.4 Формулације хидрогелова са наночестицама сребра и злата

4.4.1 Физичко-хемијске карактеристике хидрогелова са наночестицама сребра

На основу горе наведених критеријума који се тичу антиоксидативне и антимикробне активности синтетисаних наночестица сребра и злата, одабране су оне синтетисане са воденим екстрактима листа купине, са њима су направљени хидрогелови и њихова стабилност је тестирана током једногодишњег периода складиштења у мраку, на собној



температури ($T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) и у фрижидеру ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Физичко-хемијска мерења и карактеризација хидрогелова обављена је 24 сата након припреме, а затим у унапред одређеним интервалима 7, 15, 45, 60, 90, 180 и 365 дана, како би се пратиле промене током периода складиштења на обе температуре. Вредности рН, вискозност и електрична проводљивост хидрогелова су параметри који су праћени током поменутог временског периода.

4.4.1.1 Вискозност хидрогелова са наночестицама сребра

Вредности вискозности тестираних хидрогелова са наночестицама сребра, мерене током једногодишњег периода, приказане су у табели 20.

Табела 20. Вискозност blank хидрогела, хидрогелова са екстрактима купине добијеним мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс и хидрогелова са AgNPs-E синтетисаних наведеним екстрактима на собној температури и температури кључања. Узорци складиштени у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током једне године

		Вискозност [Pa·s]							
	Време (дан)	1	7	15	45	60	90	180	365
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	8,92±0,35	8,95±0,42	8,96±0,30	8,93±0,42	8,95±0,26	8,94±0,42	8,95±0,46	8,94±0,32
	X-KM	8,93±0,30	8,95±0,36	8,88±0,30	8,95±0,31	8,96±0,35	8,90±0,30	8,95±0,20	8,95±0,25
	X-KP	8,95±0,79	8,98±0,35	8,91±0,25	8,92±0,31	8,93±0,81	8,94±0,31	8,94±0,35	8,92±0,45
	X-KM CT	8,95±0,15	8,95±0,21	8,96±0,15	8,96±0,20	8,96±0,25	8,91±0,26	8,96±0,21	8,94±0,20
	X-KM TK	8,93±0,25	8,91±0,15	8,95±0,25	8,89±0,35	8,95±0,78	8,93±0,20	8,94±0,31	8,95±0,36
	X-KP CT	8,95±0,25	8,89±0,30	8,94±0,31	8,95±0,26	8,95±0,25	8,94±0,15	8,96±0,31	8,91±0,15
	X-KP TK	8,91±0,15	8,91±0,49	8,96±0,21	8,93±0,35	8,93±0,10	8,93±0,15	8,96±0,20	8,95±0,26
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	8,94±0,20	8,95±0,26	8,92±0,15	8,95±0,20	8,95±0,21	8,92±0,15	8,94±0,25	8,91±0,21
	X-KM	8,96±0,15	8,91±0,25	8,94±0,15	8,96±0,20	8,97±0,25	8,91±0,30	8,96±0,31	8,93±0,15
	X-KP	8,96±0,21	8,94±0,25	8,96±0,15	8,94±0,21	8,93±0,26	8,94±0,20	8,96±0,25	8,86±0,25
	X-KM CT	8,95±0,21	8,92±0,25	8,93±0,31	8,94±0,21	8,96±0,21	8,92±0,30	8,93±0,31	8,90±0,21
	X-KM TK	8,92±0,20	8,96±0,21	8,94±0,25	8,92±0,15	8,95±0,21	8,94±0,25	8,95±0,21	8,96±0,20
	X-KP CT	8,96±0,15	8,96±0,35	8,95±0,21	8,93±0,21	8,95±0,25	8,91±0,20	8,92±0,21	8,96±0,20
	X-KP TK	8,94±0,20	8,90±0,31	8,95±0,15	8,92±0,21	8,93±0,15	8,94±0,15	8,95±0,30	8,93±0,21
Blank – хидрогел без наночестица и екстракта		X-KM CT – хидрогел са AgNPs-E синтетисаним мацератом купине на собној T							
X-KM – хидрогел са екстрактом купине добијеним мацерацијом		X-KM TK – хидрогел са AgNPs-E синтетисаним мацератом купине на T кључања							
X-KP – хидрогел са екстрактом купине добијеним екстракцијом уз рефлукс		X-KP CT – хидрогел са AgNPs-E синтетисаним рефлукс екстрактом купине на собној T							
		X-KP TK – хидрогел са AgNPs-E синтетисаним рефлукс екстрактом купине на T кључања							

Вискозност хидрогела може имати директан утицај на брзину дифузије активне супстанце (Jiang et al., 2020). На основу вредности вискозности приказаних у табели 20, може се закључити да испитиване формулације поседују полуврсту конзистенцију. Додавање наночестица сребра или екстракта купине у базу хидрогела довело је до благог повећања привидне вискозности. Након складиштења у трајању од 12 месеци на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, није уочена значајна промена вискозности, што указује на добру физичку стабилност испитиваних формулација.

Утицај типа хидрогела и времена инкубације на вискозност провераван је у различитим временским интервалима (1, 7, 15, 45, 60, 90, 180 и 365 дана) применом једнофакторске



анализе варијансе (ANOVA). За сваку временску тачку анализирана је евентуална статистички значајна разлика између различитих типова хидрогелова (Blank, X-КМ, X-КМ СТ, X-КМ ТК, X-КР, X-КР СТ, X-КР ТК). Пре примене статистичке анализе потврђено је да су испуњене претпоставке за спровођење ANOVA теста: подаци су били нормално расподељени, узорци независни, а хомогеност варијансе је била задовољена.

Резултати су доследно показивали да на температури од $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ не постоје статистички значајне разлике у вискозности између испитиваних група у било ком временском интервалу. Насупрот томе, при температури складиштења од $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, статистички значајна разлика уочена је након 365 дана, што је захтевало спровођење додатне *post hoc* анализе коришћењем Tukey–Kramer теста (таб. 21). Ниједна група се није могла издвојити као статистички значајно различита, јер већина узорака дели исте ознаке (А или А, В или В), што је потврђено добијеним p – вредностима. Једини изузетак представља могућа разлика између узорака X-КР СТ/X-КМ ТК у односу на X-КР, али чак ни та разлика није била статистички убедљива.

Иако у *post hoc* анализи нису уочене значајне разлике између појединачних формулација, резултати ANOVA анализе указују на присуство општег ефекта формулације. Ови налази указују на потребу даље оптимизације параметара формулације са циљем побољшања уочљивости међугрупних разлика и унапређења функционалних својстава хидрогелова.

Табела 21. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) параметара вискозности за хидрогелове складиштене у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током периода од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$						
1	Хидрогел	6	0,00419	0,00069	0,8059	0,5819
	Грешка	14	0,01213	0,00086		
	Укупно	20	0,01632			
7	Хидрогел	6	0,01932	0,00322	2,3242	0,0908
	Грешка	14	0,01940	0,00138		
	Укупно	20	0,03872			
15	Хидрогел	6	0,01813	0,00302	2,3860	0,0845
	Грешка	14	0,01773	0,00126		
	Укупно	20	0,03587			
45	Хидрогел	6	0,01071	0,00178	2,4834	0,0754
	Грешка	14	0,01007	0,00072		
	Укупно	20	0,02078			
60	Хидрогел	6	0,00346	0,00057	0,8013	0,5849
	Грешка	14	0,01007	0,00072		
	Укупно	20	0,01352			
90	Хидрогел	6	0,00447	0,00074	0,5790	0,7413
	Грешка	14	0,01800	0,00128		
	Укупно	20	0,02247			
180	Хидрогел	6	0,00199	0,00033	0,3483	0,8993
	Грешка	14	0,01333	0,00095		



	Укупно	20	0,01532			
365	Хидрогел	6	0,00358	0,00059	0,5054	0,7944
	Грешка	14	0,01653	0,00118		
	Укупно	20	0,02011			
<i>T</i> = 4 °C						
1	Хидрогел	6	0,00453	0,00076	0,7278	0,6349
	Грешка	14	0,01453	0,00103		
	Укупно	20	0,01907			
7	Хидрогел	6	0,01226	0,00204	3,0211	0,0414*
	Грешка	14	0,00947	0,00068		
	Укупно	20	0,02172			
15	Хидрогел	6	0,00309	0,00052	0,7222	0,6389
	Грешка	14	0,01000	0,00071		
	Укупно	20	0,01309			
45	Хидрогел	6	0,00351	0,00059	0,4642	0,8235
	Грешка	14	0,01767	0,00126		
	Укупно	20	0,02112			
60	Хидрогел	6	0,00451	0,00075	1,0464	0,4375
	Грешка	14	0,01007	0,00072		
	Укупно	20	0,01458			
90	Хидрогел	6	0,00291	0,00049	0,3579	0,8935
	Грешка	14	0,01900	0,00136		
	Укупно	20	0,02191			
180	Хидрогел	6	0,00459	0,00077	1,2853	0,3253
	Грешка	14	0,00833	0,00060		
	Укупно	20	0,01292			
365	Хидрогел	6	0,02046	0,00341	3,3934	0,0279*
	Грешка	14	0,01407	0,00101		
	Укупно	20	0,03452			
Connecting Letters Report						
Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка		
7	X-KM TK	A	8,8967	0,01501		
7	X-KP CT	A	8,9067	0,01501		
7	Blank	A	8,9233	0,01501		
7	X-KP	A	8,9433	0,01501		
7	X-KM CT	A	8,9533	0,01501		
7	X-KM	A	8,9567	0,01501		
7	X-KP TK	A	8,9633	0,01501		
365	X-KP CT	A	8,9567	0,01830		
365	X-KM TK	A	8,9567	0,01830		
365	X-KM	A B	8,9333	0,01830		
365	X-KP TK	A B	8,9333	0,01830		
365	Blank	A B	8,9133	0,01830		
365	X-KM CT	A B	8,8967	0,01830		
365	X-KP	B	8,8633	0,01830		

Скраћенице су дате у табели 20

Имајући у виду резултате приказане у табелама 20 и 21, може се закључити да су хидрогелови формирани од карбомера 940 са екстрактима и AgNPs-E показали значајну стабилност у погледу вискозности током периода од годину дана на $T = 22\text{ °C}$ и $T = 4\text{ °C}$.

Вискозност хидрогелова је критични параметар који значајно варира у зависности од њихове примене. Хидрогелови формулисани за локалну или дерматолошку употребу обично захтевају ниску до умерену вискозност како би се осигурала адекватна мазивост и удобност пацијента (Binder et al., 2019), док формулације дизајниране за негу рана често захтевају већу вискозност како би се одржао структурни интегритет и продужено пријањање на место примене (Boateng et al., 2008; Binder et al., 2019). Насупрот томе, хидрогелови развијени за контролисано или продужено ослобађање лека показују



специфично прилагођене реолошке профиле како би модулирали кинетику ослобађања активног фармацеутског састојка (Thang et al., 2023). Ове функционалне разлике се обично постижу променом састава полимера, густине умрежавања, молекулске тежине и садржаја воде, тј. фактора који заједно утичу на вискоеластично понашање хидрогелова (Blažić et al., 2023). Оптимизација вискозности је стога неопходна за испуњавање механичких и терапеутских захтева коначне формулације.

Вредности вискозности мерене у формулисаним хидрогеловима указују на одличну термичку и физичку стабилност, пошто су забележене минималне варијације под различитим условима складиштења. На пример, неутралисани хидрогелови Carborol 940 у концентрацији од 0,7% обично показују вискозност око 26,56 Pa·s (Shah et al., 2021), док стандардни системи на бази карбомера фармацеутског квалитета могу достићи вредности између 40 и 60 Pa·s, у зависности од концентрације и степена неутрализације. Системи који укључују наноносаче, као што су липозоми или ниозоми, често показују значајно смањење вискозности због делимичног поремећаја полимерне мреже (Dejeu et al., 2022).

У овом истраживању, упркос уградњи наночестица сребра стабилованих воденим екстрактом листа купине, хидрогел је задржао структурни интегритет и стабилан профил вискозности, што указује на повољне интеракције између биоактивних састојака и полимерне матрице. Уочена вискозност ($\sim 8,9$ Pa·s) указује на добру мазивост, лакоћу примене и потенцијално побољшану дифузију активних једињења – карактеристике пожељне код топикалних антимикуробних препарата или формулација намењених за зарастање рана. Стога, иако испитивана формулација показује умерену вискозност, она постиже функционалну равнотежу између реолошке стабилности и једноставне примене, што је чини погодном за локалну примену.

4.4.1.2 рН вредности хидрогелова са наночестицама сребра

Мерења рН вредности су вршена у циљу процене стабилности коначних формулација, имајући у виду да на промене рН вредности могу утицати фактори околине као што су флукуације температуре, изложеност светлости и промене у влажности током периода складиштења. Вредности рН развијених хидрогелова кретале су се од $4,90 \pm 0,02$ до $5,43 \pm 0,01$ (таб. 22), што указује на погодност за локалну примену. Упоредиве резултате су објавили Tamboli и сарадници (2025), који су пратили рН вредности гелова формулисаних под сличним условима користећи наночестице сребра стабиловане воденим екстрактом листова *Brugmansia suaveolens*. Слично томе, Kolekar и сарадници



(2023) су добили конзистентне pH профиле за хидрогелове који садрже AgNP синтетисане употребом екстракта семена и листа *Annona squamosa*.

Табела 22. Вредности pH blank хидрогела, хидрогелова са екстрактима купине добијеним мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс и хидрогелова са AgNPs-Е синтетисаним наведеним екстрактима на собној температури и температури кључања. Узорци складиштени у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током једне године

		pH вредност							
	Време (дан)	1	7	15	45	60	90	180	365
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	5,45±0,02	5,04±0,02	5,00±0,06	5,04±0,03	4,98±0,01	5,22±0,02	5,35±0,03	5,03±0,02
	X-КМ	5,30±0,02	5,00±0,04	4,95±0,03	4,97±0,04	4,85±0,05	5,22±0,04	5,34±0,03	5,04±0,01
	X-КР	5,17±0,03	5,05±0,01	4,95±0,04	5,01±0,02	5,04±0,02	5,21±0,01	5,33±0,03	5,06±0,02
	X-КМ СТ	5,22±0,01	5,06±0,03	5,02±0,02	5,09±0,04	5,02±0,01	5,25±0,02	5,36±0,01	4,95±0,06
	X-КМ Тк	5,03±0,04	5,01±0,05	4,98±0,02	4,98±0,03	4,92±0,01	5,14±0,01	5,21±0,02	5,06±0,04
	X-КР СТ	5,12±0,02	4,96±0,03	4,94±0,02	4,95±0,04	4,94±0,03	5,16±0,02	5,29±0,02	5,01±0,04
	X-КР ТК	5,06±0,03	5,03±0,02	5,00±0,03	5,05±0,01	5,00±0,02	5,23±0,03	5,38±0,02	5,12±0,02
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	5,38±0,01	5,16±0,01	4,80±0,05	5,22±0,02	4,90±0,03	5,32±0,02	5,42±0,02	5,32±0,01
	X-КМ	5,03±0,02	5,04±0,03	4,90±0,02	5,05±0,02	4,85±0,06	5,20±0,02	5,42±0,01	5,02±0,02
	X-КР	5,10±0,02	5,08±0,01	4,89±0,04	5,07±0,01	5,04±0,02	5,00±0,03	5,42±0,01	5,10±0,02
	X-КМ СТ	5,18±0,01	5,02±0,03	4,98±0,05	5,05±0,02	5,02±0,03	5,33±0,02	5,43±0,01	5,11±0,03
	X-КМ Тк	5,00±0,03	5,01±0,02	4,90±0,04	5,00±0,02	4,92±0,05	5,24±0,02	5,36±0,03	5,07±0,02
	X-КР СТ	5,09±0,01	5,02±0,03	4,90±0,02	5,05±0,01	4,94±0,03	5,32±0,01	5,42±0,04	5,09±0,06
	X-КР ТК	5,00±0,03	5,04±0,05	4,95±0,02	5,03±0,01	5,00±0,02	5,31±0,04	5,41±0,02	5,10±0,03

Скраћенице су дате у табели 20

Вредности pH измерене за развијене хидрогелове остале су у физиолошком опсегу људске коже (4,0 – 5,96), што је кључно за дермалну компатибилност и дугорочну безбедност примене (Ansari, 2009). Благо смањење pH вредности забележено је у узорцима чуваним на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ током складиштења. Ово смањење може бити повезано са постепеним променама унутар формулације, као што су хидролиза, процеси оксидације или формирање слабо киселих производа разградње. Хидролитичка разградња полимерних ланаца може се десити током времена, ослобађајући карбоксилне и друге киселе функционалне групе које постепено повећавају киселост система (Islam et al., 2004). Микробна контаминација може додатно допринети смањењу pH вредности кроз производњу органских киселина као што су млечна или сирћетна киселина уколико формулација није потпуно стерилна или садржи хранљиве материје. Поред тога, оксидативне трансформације биоактивних једињења (нпр. биљних полифенола или протеина) могу генерисати киселе нуспроизводе, док губитак или дифузија пуферских средстава, која су првобитно стабилизovala формулацију, може смањити способност система да одржи неутрални pH. Заједно, ови процеси доводе до пада pH вредности, што потенцијално утиче на хемијску стабилност, механички интегритет и биоактивне перформансе хидрогела (Kolman et al., 2021). Уочена промена pH вредности од 0,5 јединица (таб. 22) сматра се малом и не очекује се да ће утицати на



биолошку компатибилност хидрогелова, јер тако мала промена остаје унутар опсега толеранције за кожу и друге биолошке системе.

Статистичка евалуација коришћењем једнофакторске ANOVA и Tukey-Kramer *post hoc* теста потврдила је да је варијација pH вредности између различитих формулација хидрогелова била значајна у неколико временских тачака. Детаљни статистички резултати приказани су у табели 23.

Табела 23. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) pH параметара за хидрогелове складиштене на тамном и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ током периода од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
1	Хидрогелови	6	0,37851	0,06311	32,9552	<0,0001*
	Грешка	14	0,02680	0,00191		
	Укупно	20	0,40531			
7	Хидрогелови	6	0,02203	0,00367	3,5045	0,0249*
	Грешка	14	0,01467	0,00104		
	Укупно	20	0,03670			
15	Хидрогелови	6	0,03383	0,00563	4,2899	0,0116*
	Грешка	14	0,01840	0,00131		
	Укупно	20	0,05223			
45	Хидрогелови	6	0,04829	0,00805	11,0479	0,0001*
	Грешка	14	0,01020	0,00073		
	Укупно	20	0,05849			
60	Хидрогелови	6	0,07878	0,01310	20,1265	<0,0001*
	Грешка	14	0,00913	0,00065		
	Укупно	20	0,08791			
90	Хидрогелови	6	0,01756	0,00293	2,5399	0,0707
	Грешка	14	0,01613	0,00115		
	Укупно	20	0,03370			
180	Хидрогелови	6	0,01460	0,00243	1,6484	0,2064
	Грешка	14	0,02067	0,00147		
	Укупно	20	0,03527			
365	Хидрогелови	6	0,04632	0,00772	7,7206	0,0008*
	Грешка	14	0,01400	0,00100		
	Укупно	20	0,06032			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
1	Blank	A	5,4467	0,02526
	X-KM	B	5,3033	0,02526
	X-KM CT	B C	5,2200	0,02526
	X-KP	B C	5,1867	0,02526
	X-KP CT	C D	5,1233	0,02526
	X-KP TK	D	5,0567	0,02526
	X-KM TK	D	5,0333	0,02526
7	X-KM CT	A	5,0567	0,01869
	X-KP	A	5,0533	0,01869
	X-KP TK	A B	5,0433	0,01869
	Blank	A B	5,0400	0,01869
	X-KM TK	A B	5,0133	0,01869
	X-KM	A B	5,0000	0,01869
	X-KP CT	B	4,9600	0,01869
15	X-KM CT	A	5,0233	0,02093
	Blank	A	5,0033	0,02093
	X-KP TK	A B	5,0000	0,02093
	X-KP	A B	4,9533	0,02093
	X-KM	A B	4,9500	0,02093
	X-KP CT	A B	4,9400	0,02093
	X-KM TK	B	4,9000	0,02093
45	X-KM CT	A	5,0933	0,01558
	X-KP TK	A B	5,0667	0,01558
	Blank	A B C	5,0433	0,01558
	X-KP	B C D	5,0133	0,01558



	X-KM TK	B C D	5,0000	0,01558
	X-KM	C D	4,9733	0,01558
	X-KP CT	D	4,9467	0,01558
60	X-KP	A	5,0433	0,01475
	X-KM CT	A	5,0233	0,01475
	X-KP TK	A B	5,0000	0,01475
	Blank	A B C	4,9800	0,01475
	X-KP CT	B C	4,9433	0,01475
	X-KM TK	C D	4,9167	0,01475
	X-KM	D	4,8533	0,01475
365	X-KP TK	A	5,1233	0,01826
	X-KM TK	A B	5,0667	0,01826
	X-KP	A B	5,0567	0,01826
	X-KP CT	A B	5,0467	0,01826
	X-KM	A B C	5,0367	0,01826
	Blank	B C	5,0300	0,01826
	X-KM CT	C	4,9533	0,01826

Звезда (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 20

ANOVA анализа pH вредности хидрогелова складиштених на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ показала је постојање статистички значајних разлика између формулација у већини испитиваних временских тачака (1, 7, 15, 45, 60 и 365 дана, $p < 0,05$, таб. 23). Најизраженије разлике су регистроване првог дана складиштења, што указује на снажан почетни утицај методе екстракције (мацерација у односу на екстракцију уз рефлукс) и температуре синтезе AgNPs-E на pH вредност матрице. Ови резултати су у складу са подацима из литературе, где је наведено да примена биљних екстраката и наночестица у хидрогелним матрицама може изазвати значајне промене pH вредности услед уношења нових јона и промене хемијске равнотеже у систему (Ilić-Stojanović et al., 2023; Gao and Xu, 2025). Временом, разлике у pH вредностима између хидрогелних формулација постају мање изражене, што може бити последица постепених физичко-хемијских промена унутар гела, укључујући јонску дифузију, преуређење полимерне мреже, као и могуће процесе оксидације и разградње активних састојака. Након 90. и 180. дана није забележена статистички значајна разлика ($p > 0,05$), што сугерише да долази до делимичног изједначавања pH вредности између различитих формулација током међупериода складиштења. Овај феномен може бити резултат успостављања нове хемијске равнотеже у систему и стабилизације наночестица сребра, што је такође примећено у сродним студијама на сличним системима (Wang et al., 2019).

Ипак, након годину дана, одређене формулације, првенствено оне са наночестицама синтетисаним на повишеним температурама (X-KP TK, X-KM TK), показале су вишу и стабилнију pH вредност у поређењу са формулацијама са мацератом и/или са наночестицама синтетисаним на собној температури (X-KM CT, X-KM) (резултати су добијени *post hoc* Tukey-Kramer тестом, таб. 23). Ови резултати указују на важност



радне температуре синтезе наночестица и типа екстракције, што може бити повезано са бољом стабилношћу мреже и споријом разградњом активних компоненти у тим системима. Слично томе, у студијама стабилности хидрогелова на бази биљних екстраката, доказано је да је виша температура током синтезе у корелацији са повећаном хемијском и структурном стабилношћу гелова (Lavrentev et al., 2023).

Практичне импликације ових резултата огледају се у чињеници да избор методе екстракције и температуре синтезе може значајно утицати на дугорочну стабилност и компатибилност хидрогелова са кожом, што је од посебног значаја за њихову примену у медицинској и козметичкој индустрији.

Слична анализа је спроведена за рН вредности хидрогелова складиштених на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (таб. 24) и такође је указала на присуство статистички значајних разлика између тестираних формулација у скоро свим временским тачкама (1, 7, 15, 45, 60, 90 и 365 дана; $p < 0,001$), док је само након 180 дана разлика била на граници статистичке значајности ($p = 0,0603$). Најизраженији ефекат формулације на очување рН вредности примећен је око 15. и 90. дана, током којих је Х-КМ СТ хидрогел показао супериорну стабилност у поређењу са другим формулацијама. Приметно је да се Х-КМ СТ константно рангирао међу узорцима са најбољим перформансама током више временских тачака (15. и 90. дана), често делећи највише рН вредности са другим водећим варијантама као што су Х-КР СТ и Blank. Ови трендови указују на то да хидрогелови чувани на собној температури ($T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$), посебно они са Х-КМ и Х-КР екстрактима, могу показати релативно већу (побољшану) хемијску стабилност под умереним термичким условима. Ова побољшана стабилност се може приписати нижим стопама разградње полимера и ефикаснијем очувању биоактивних једињења на собној температури (Sancho et al., 2014).

Табела 24. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) рН параметара за хидрогелове складиштене на тамном и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ током периода од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
1	Хидрогел	6	0,32142	0,05357	74,5033	<0,0001*
	Грешка	14	0,01006	0,00072		
	Укупно	20	0,33149			
7	Хидрогел	6	0,04644	0,00774	7,0681	0,0013*
	Грешка	14	0,01533	0,00109		
	Укупно	20	0,06178			
15	Хидрогел	6	0,05573	0,00929	10,3759	0,0002*
	Грешка	14	0,01253	0,00089		
	Укупно	20	0,06826			
45	Хидрогел	6	0,08662	0,01444	25,2667	<0,0001*
	Грешка	14	0,00800	0,00057		
	Укупно	20	0,09463			
60	Хидрогел	6	0,08612	0,01435	14,5620	<0,0001*



	Грешка	14	0,01380	0,00098		
	Укупно	20	0,09992			
90	Хидрогел	6	0,25719	0,04286	48,6577	<0,0001*
	Грешка	14	0,01233	0,00088		
	Укупно	20	0,26952			
180	Хидрогел	6	0,01125	0,00187	2,6803	0,0603
	Грешка	14	0,00980	0,00070		
	Укупно	20	0,02105			
365	Хидрогел	6	0,17291	0,02882	24,0966	<0,0001*
	Грешка	14	0,01674	0,00119		
	Укупно	20	0,18966			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
1	Blank	A	5,3767	0,01548
	X-KM CT	B	5,1767	0,01548
	X-KP	B C	5,1033	0,01548
	X-KP CT	CD	5,0900	0,01548
	X-KM	D E	5,0267	0,01548
	X-KM TK	E	5,0000	0,01548
	X-KP TK	E	5,0000	0,01548
7	Blank	A	5,1567	0,01911
	X-KP	A	5,0767	0,01911
	X-KP TK	B	5,0433	0,01911
	X-KM	B	5,0367	0,01911
	X-KP CT	B	5,0233	0,01911
	X-KM CT	B	5,0200	0,01911
	X-KM TK	B	5,0100	0,01911
15	X-KM TK	A	4,9833	0,01727
	X-KP TK	A B	4,9467	0,01727
	X-KM	A B	4,9033	0,01727
	X-KM TK	A B	4,9000	0,01727
	X-KP CT	A B	4,9000	0,01727
	X-KP	B C	4,8867	0,01727
	Blank	C	4,8033	0,01727
45	Blank	A	5,2167	0,01380
	X-KP	B	5,0700	0,01380
	X-KM	B	5,0533	0,01380
	X-KP CT	B C	5,0533	0,01380
	X-KM CT	B C	5,0467	0,01380
	X-KP TK	B C	5,0267	0,01380
	X-KM TK	C	5,0033	0,01380
60	X-KP	A	5,0367	0,01813
	X-KM CT	A B	5,0167	0,01813
	X-KP TK	A B C	5,0000	0,01813
	X-KP CT	B C D	4,9433	0,01813
	X-KM TK	C DE	4,9233	0,01813
	Blank	D E	4,8967	0,01813
	X-KM	E	4,8467	0,01813
90	X-KM CT	A	5,3300	0,01714
	Blank	A	5,3233	0,01714
	X-KP CT	A	5,3233	0,01714
	X-KP TK	A B	5,3067	0,01714
	X-KM TK	B C	5,2367	0,01714
	X-KM	C	5,1967	0,01714
	X-KP	D	5,0000	0,01714
365	Blank	A	5,3233	0,01997
	X-KM CT	B	5,1133	0,01997
	X-KP TK	B	5,1000	0,01997
	X-KP CT	B	5,0933	0,01997
	X-KM TK	B	5,0667	0,01997
	X-KP	B	5,0613	0,01997
	X-KM	B	5,0233	0,01997

Звездица (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 20

За разлику од складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, конвергенција рН вредности између формулација након 365. дана је израженија – већина хидрогелова (осим Blank узорка) је



груписана у исту статистичку групу према *post hoc* анализи (таб. 24). Овај резултат може указивати на то да нижа температура складиштења фаворизује очување структурних карактеристика и смањење међугрупне разлике у кинетици рН промена. У литератури је примећено да ниске температуре успоравају процесе дифузије и разградње у хидрогеловима, што може довести до смањења промена рН вредности током времена (Ahmed, 2015).

Занимљиво је да је чак и када се чува на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Blank током већег дела периода показао статистички значајно вишу рН вредност у поређењу са третираним формулацијама, што потврђује хипотезу да присуство екстраката и наночестица има значајан утицај на почетну и дугорочну хемијску равнотежу система.

Укратко, добијени резултати указују да су за очување оптималних рН карактеристика током дуготрајног складиштења кључни фактори метод екстракције, температура синтезе, али и температура складиштења. Комбинација екстракције уз рефлукс, синтезе на вишим температурама и складиштења на нижој температури, може представљати оптималну стратегију за припрему стабилних хидрогелова са предвидљивим рН профилем током времена.

Утицај температуре складиштења на рН хидрогелова у зависности од времена складиштења. Резултати показују да температура складиштења значајно утиче на рН вредност хидрогела током времена. Првог дана, хидрогелови складиштени на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ су имали значајно вишу рН вредност у поређењу са оним складиштеним на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p = 0,0485$), што су потврдиле различите статистичке групе у Connecting Letters извештају (таб. 25). Box plot промене рН вредности хидрогелова током складиштења приказан је на слици 54. Током првих седам дана, разлика између рН вредности хидрогелова у контексту температуре складиштења није била статистички значајна ($p = 0,0694$). Међутим, након 15 дана примећује се промена: рН вредност на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ постаје значајно виша него на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p = 0,0005$), што је јасно видљиво у табели 25. Након 45, 90, 180 и 365 дана, рН вредности хидрогелова складиштених на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ постају значајно више од оних на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$ за све тачке), што је најизраженије након 180. дана ($p < 0,0001$), и потврђено је статистичким групама у табели 25.

Презентовани резултати указују да складиштење на нижој температури омогућава бољу дугорочну рН стабилност хидрогела. Слични резултати су објављени и у неким ранијим студијама (Wang et al., 2019).

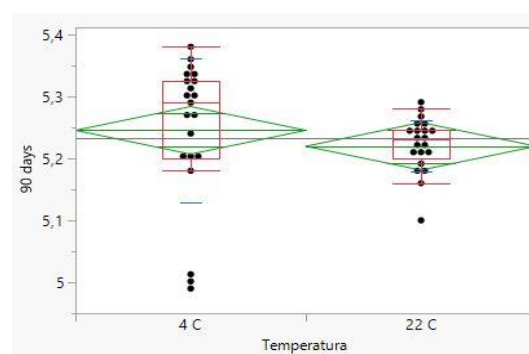
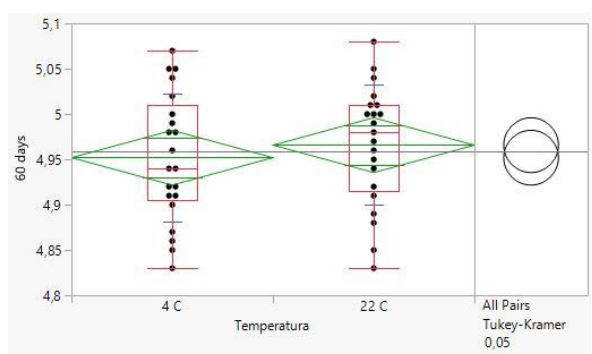
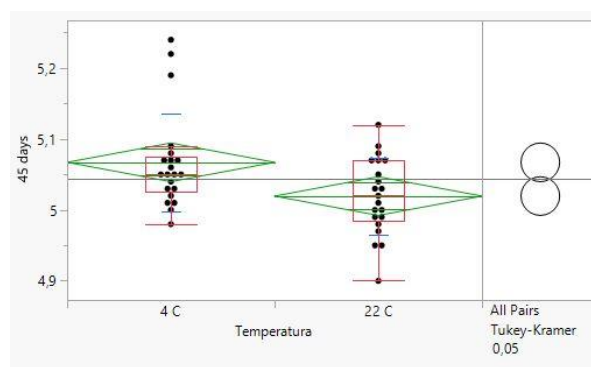
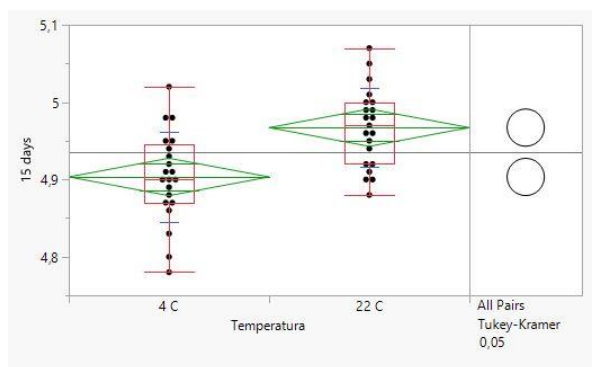
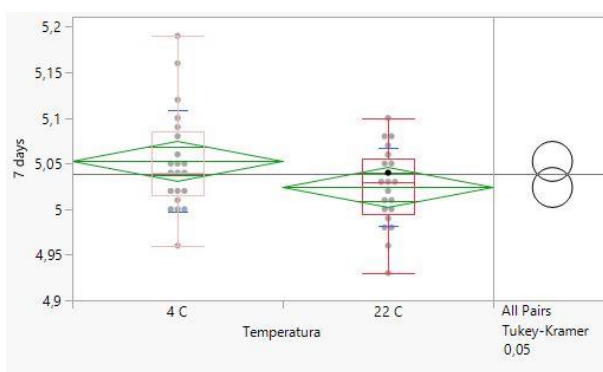
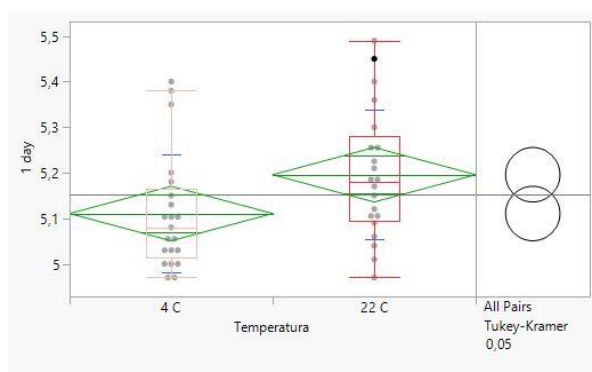


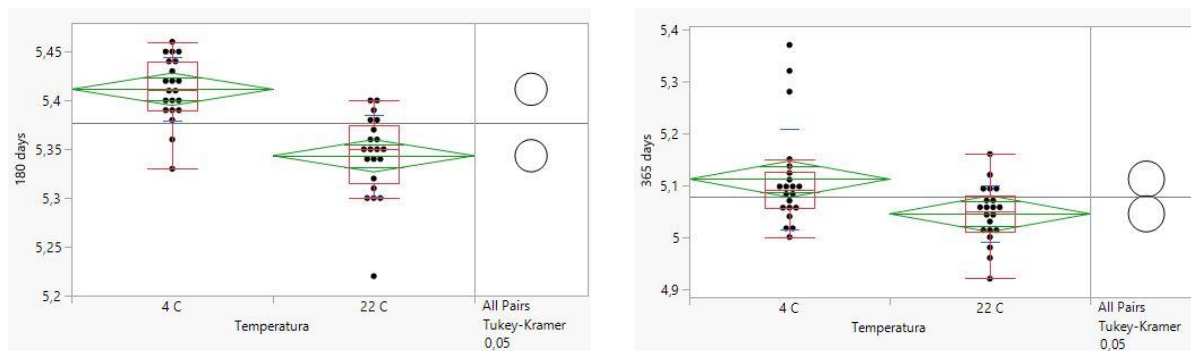
Табела 25. Резултати ANOVA теста и Connecting Letters Report извештај за pH вредности хидрогелова на различитим температурама складиштења током времена

Време (дан)	Температура	Број узорака	Ниво (letter)	Средња вредност (pH)	Стандардна грешка	F-однос	p-вредност
1	4 °C	21	A	5,1105	0,0296	4,1415	0,0485
	22 °C	21	B	5,1957	0,0296		
7	4 °C	21	A	5,0524	0,0108	3,4816	0,0694
	22 °C	21	A	5,0238	0,0108		
15	4 °C	21	A	4,9033	0,0120	14,1922	0,0005*
	22 °C	21	B	4,9671	0,0120		
45	4 °C	21	A	5,0671	0,0135	6,2197	0,0169*
	22 °C	21	B	5,0195	0,0135		
60	4 °C	21	A	4,9519	0,0150	0,4264	0,5175
	22 °C	21	A	4,9657	0,0150		
90	4 °C	21	A	5,2276	0,0244*	--	0,0376**
	22 °C	21	B	5,1676	0,0140*		
180	4 °C	21	A	5,4114	0,0082	34,5773	<0,0001
	22 °C	21	B	5,3433	0,0082		
365	4 °C	21	A	5,1116	0,0173	7,5099	0,0091
	22 °C	21	B	5,0448	0,0173		

* За 90 дана стандардна грешка узета из Steel-Dwass анализе.

** За 90 дана је коришћен не-параметарски Steel-Dwass тест.





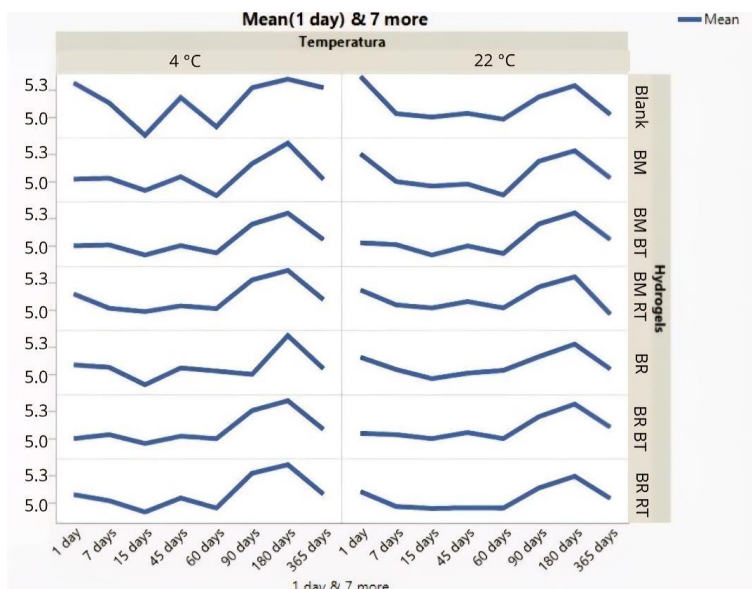
Слика 54. Box plot промене рН вредности хидрогелова током складиштења на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1, 7, 15, 45, 90, 180 и 365 дана)

Анализа промене рН вредности није показала статистички значајну разлику између испитиваних температура складиштења (таб. 26). Ово указује на то да се, у просеку, рН вредност формулација одржава стабилном током једногодишњег периода без обзира на температуру складиштења. Са становишта уштеде енергије, складиштење на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ може бити економски повољније, али је потребно узети у обзир и друге параметре стабилности и захтеве примене, као и специфичне разлике између формулација идентификоване у другим временским тачкама и анализама.

Табела 26. Резултати ANOVA теста за рН вредности хидрогелова током једногодишњег складиштења

Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
Температура	1	0,0662	0,0662	2,33	0,1278
Грешка	334	9,4852	0,0284		
Укупно	335	9,5514			

Промене рН вредности за све формулације хидрогелова током складиштења на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ приказане су на слици 55. График илуструје да су рН вредности генерално стабилније и више када се хидрогелови складиште на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, посебно за формулације Х-КМ СТ, Х-КР СТ и Х-КР ТК. Насупрот томе, узорци чувани на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ показали су веће флукуације и благи пад рН вредности током времена код одређених формулација. Статистички значајне разлике у рН вредности између различитих формулација и/или температура примећене су у већини временских тачака, што је потврђено ANOVA и *post hoc* тестовима одређеним између (таб. 23, 24, 26). Најизраженије разлике регистроване су након 1, 15, 45, 90, 180. и 365. дана, док су средње рН вредности након 7, 60. и 180. дана показале тенденцију изједначавања (нпр. Х-КМ СТ и Х-КР СТ). Статистички значајне разлике су означене у табелама словима или звездицама.



Слика 55. Динамика промене рН вредности различитих хидрогелова приликом складиштења на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ током 1, 7, 15, 45, 60, 90, 180 и 365 дана

4.4.1.3 Електрична проводљивост хидрогелова са наночестицама сребра

Електрична проводљивост хидрогелова зависи од конјуговане структуре проводљивих полимера која се састоји од делокализованих π веза (Zhou et al., 2022). У већини случајева, хидрогелови немају карактеристику проводљивости, па се елементи који поседују ову карактеристику уграђују у структуру. Један од начина за добијање таквих хидрогелова је додавање проводљивих честица у матрицу хидрогела (Naficy et al., 2012). Проводљивост од $\sim 5\text{ mS cm}^{-1}$ (таб. 27) указује да хидрогел садржи умерен ниво мобилних јона и понаша се као слабо до умерено проводљив водени систем. Електрична проводљивост хидрогелова зависи углавном од концентрације и мобилности јона унутар њихове полимерне мреже испуњене водом. На њу утичу врста и количина присутних соли или пуферских компоненти, степен јонизације функционалних група у полимерним ланцима (нпр. $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{NH}_3^+$), густина умрежавања (која утиче на садржај воде и дифузију јона) и присуство биоактивних или наелектрисаних адитива (Kougkolos et al., 2023; Lee et al., 2018). Електрична проводљивост хидрогелова може се мењати између нижих и виших вредности (као што је приказано у таб. 27), током различитих периода складиштења, јер је систем динамичан и неколико процеса се истовремено одвија и конкуришу (дифузија јона, разградња полимера, сорпција или губитак воде и могућа микробна активност) (Almeida et al., 2025). Електрична проводљивост испитиваних формулација након једногодишњег



складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ кретала се од $4,97 \pm 0,06$ до $7,01 \pm 0,01\text{ mScm}^{-1}$, и од $4,58 \pm 0,02$ до $6,98 \pm 0,03\text{ mScm}^{-1}$, респективно (таб. 27). Током складиштења уочене промене електричне проводљивости највероватније су последица промена у мобилности и расподели јона унутар полимерне мреже. Ове промене могу бити условљене реорганизацијом структуре хидрогела, као и интеракцијама између полимерних ланаца и инкорпорираних компоненти, што утиче на доступност и покретљивост јонских врста. Међутим, овај занемарљив пад електричне проводљивости могао би указивати и на релативно добру стабилност тестираних формулација.

Табела 27. Електрична проводљивост blank хидрогела, хидрогелова са екстрактима купине добијеним мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс и хидрогелова са AgNPs-Е синтетисаним наведеним екстрактима на собној температури и температури кључања. Узорци складиштени у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током једне године

Електрична проводљивост [mScm^{-1}]									
Време (дан)	1	7	15	45	60	90	180	365	
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	$6,72 \pm 0,02$	$6,84 \pm 0,01$	$6,86 \pm 0,01$	$6,04 \pm 0,03$	$5,04 \pm 0,06$	$6,59 \pm 0,03$	$4,97 \pm 0,06$	$6,75 \pm 0,01$
	X-KM	$6,73 \pm 0,02$	$6,60 \pm 0,01$	$6,45 \pm 0,03$	$6,56 \pm 0,02$	$5,31 \pm 0,04$	$6,23 \pm 0,03$	$5,31 \pm 0,06$	$6,54 \pm 0,01$
	X-KP	$6,81 \pm 0,01$	$6,62 \pm 0,03$	$6,70 \pm 0,01$	$6,60 \pm 0,02$	$6,54 \pm 0,02$	$6,61 \pm 0,04$	$6,54 \pm 0,01$	$6,23 \pm 0,02$
	X-KM CT	$6,94 \pm 0,02$	$6,88 \pm 0,01$	$6,71 \pm 0,01$	$6,70 \pm 0,03$	$6,25 \pm 0,04$	$5,51 \pm 0,04$	$6,25 \pm 0,02$	$6,99 \pm 0,03$
	X-KM TK	$6,98 \pm 0,05$	$6,81 \pm 0,02$	$7,01 \pm 0,01$	$6,67 \pm 0,01$	$6,59 \pm 0,03$	$6,70 \pm 0,05$	$6,59 \pm 0,01$	$5,92 \pm 0,05$
	X-KP CT	$6,89 \pm 0,03$	$6,84 \pm 0,01$	$6,94 \pm 0,04$	$6,93 \pm 0,01$	$6,82 \pm 0,02$	$6,56 \pm 0,02$	$6,82 \pm 0,01$	$6,05 \pm 0,02$
	X-KP TK	$6,78 \pm 0,01$	$6,68 \pm 0,02$	$6,68 \pm 0,01$	$6,66 \pm 0,03$	$5,04 \pm 0,05$	$5,79 \pm 0,04$	$5,04 \pm 0,06$	$6,43 \pm 0,01$
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	$6,72 \pm 0,02$	$6,80 \pm 0,02$	$6,68 \pm 0,03$	$6,60 \pm 0,04$	$5,20 \pm 0,03$	$6,65 \pm 0,01$	$5,04 \pm 0,02$	$6,53 \pm 0,01$
	X-KM	$6,73 \pm 0,01$	$6,50 \pm 0,03$	$6,50 \pm 0,01$	$6,63 \pm 0,04$	$6,60 \pm 0,02$	$6,32 \pm 0,03$	$6,60 \pm 0,01$	$6,42 \pm 0,02$
	X-KP	$6,81 \pm 0,02$	$6,55 \pm 0,04$	$6,54 \pm 0,06$	$6,36 \pm 0,02$	$4,68 \pm 0,06$	$6,55 \pm 0,01$	$4,58 \pm 0,02$	$6,28 \pm 0,03$
	X-KM CT	$6,94 \pm 0,05$	$6,80 \pm 0,03$	$6,60 \pm 0,01$	$6,13 \pm 0,02$	$4,58 \pm 0,05$	$5,50 \pm 0,04$	$4,58 \pm 0,02$	$6,42 \pm 0,02$
	X-KM TK	$6,98 \pm 0,03$	$6,75 \pm 0,04$	$6,63 \pm 0,02$	$6,63 \pm 0,01$	$6,55 \pm 0,02$	$6,64 \pm 0,01$	$6,55 \pm 0,03$	$6,68 \pm 0,02$
	X-KP CT	$6,89 \pm 0,02$	$6,78 \pm 0,01$	$6,49 \pm 0,02$	$6,70 \pm 0,03$	$6,40 \pm 0,01$	$6,50 \pm 0,04$	$6,40 \pm 0,02$	$5,98 \pm 0,03$
	X-KP TK	$6,78 \pm 0,02$	$6,60 \pm 0,03$	$6,61 \pm 0,01$	$6,71 \pm 0,02$	$6,42 \pm 0,04$	$5,83 \pm 0,02$	$6,42 \pm 0,01$	$6,08 \pm 0,04$

Скраћенице су дате у Табели 20

Једнофакторска ANOVA је примењена да би се испитала разлика у електричној проводљивости између различитих формулација хидрогелова током испитиваног периода на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Сва три услова за примену ANOVA су испуњена. Резултати недвосмислено показују да тип хидрогела значајно утиче на електричну проводљивост, при чему су разлике између група статистички значајне у свим временским тачкама (таб. 28).

Табела 28. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) параметара електричне проводљивости за хидрогелове складиштене на тамном и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ током периода складиштења од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
1	Хидрогел	6	0,18244	0,03040	35,2799	<0,0001*
	Грешка	14	0,01206	0,00086		
	Укупно	20	0,19451			
7	Хидрогел	6	0,23842	0,03973	84,2929	<0,0001*
	Грешка	14	0,00660	0,00047		
	Укупно	20	0,24502			
15	Хидрогел	6	0,63691	0,10615	119,8495	<0,0001*



	Грешка	14	0,01240	0,00088		
	Укупно	20	0,64931			
45	Хидрогел	6	1,30972	0,21828	332,1763	<0,0001*
	Грешка	14	0,00920	0,00065		
	Укупно	20	1,31892			
60	Хидрогел	6	11,0020	1,83361	1351,1350	<0,0001*
	Грешка	14	0,01900	0,00130		
	Укупно	20	11,0210			
90	Хидрогел	6	3,88991	0,64832	560,2757	<0,0001*
	Грешка	14	0,01620	0,00115		
	Укупно	20	3,90611			
180	Хидрогел	6	11,3441	1,89070	3676,3550	<0,0001*
	Грешка	14	0,00720	0,00051		
	Укупно	20	11,3513			
365	Хидрогел	6	2,60559	0,43426	317,7549	<0,0001*
	Грешка	14	0,01913	0,00136		
	Укупно	20	2,62472			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
1	X-KM TK	A	6,9767	0,01695
	X-KM CT	A B	6,9400	0,01695
	X-KP CT	B C	6,8867	0,01695
	X-KP	C D	6,8133	0,01695
	X-KP TK	D E	6,7800	0,01695
	X-KM	D E	6,7333	0,01695
	Blank	E	6,7200	0,01695
7	X-KM CT	A	6,8833	0,01254
	Blank	A B	6,8400	0,01254
	X-KP CT	A B	6,8367	0,01254
	X-KM TK	B	6,8067	0,01254
	X-KP TK	C	6,6767	0,01254
	X-KP	C D	6,6233	0,01254
15	X-KM	D	6,6033	0,01254
	X-KM TK	A	7,0133	0,01718
	X-KP CT	A B	6,9367	0,01718
	Blank	B	6,8600	0,01718
	X-KM CT	C	6,7067	0,01718
	X-KP	C	6,7033	0,01718
45	X-KP TK	C	6,6767	0,01718
	X-KM	D	6,4533	0,01718
	X-KP CT	A	6,9267	0,01480
	X-KM CT	B	6,7033	0,01480
	X-KM TK	B C	6,6700	0,01480
	X-KP TK	B C	6,6567	0,01480
60	X-KP	C D	6,6033	0,01480
	X-KM	D	6,5633	0,01480
	Blank	E	6,0433	0,01480
	X-KP CT	A	6,8200	0,02127
	X-KM TK	B	6,5867	0,02127
	X-KP	B	6,5367	0,02127
90	X-KM CT	C	6,2467	0,02127
	X-KM	D	5,3133	0,02127
	Blank	E	5,0367	0,02127
	X-KP TK	E	5,0367	0,02127
	X-KM TK	A	6,7033	0,01964
	X-KP	A B	6,6133	0,01964
180	Blank	B	6,5867	0,01964
	X-KP CT	B	6,5600	0,01964
	X-KM	C	6,2267	0,01964
	X-KP TK	D	5,7867	0,01964
	X-KM CT	E	5,5133	0,01964
	X-KP CT	A	6,8200	0,01309
365	X-KM TK	B	6,5867	0,01309
	X-KP	B	6,5433	0,01309
	X-KM CT	C	6,2467	0,01309
	X-KM	D	5,3133	0,01309
	X-KP TK	E	5,0433	0,01309
	Blank	F	4,9733	0,01309
365	X-KM CT	A	6,9867	0,02134
	Blank	B	6,7467	0,02134
	X-KM	C	6,5433	0,02134
	X-KP TK	D	6,4333	0,02134
	X-KP	E	6,2300	0,02134



X-KP CT	F	6,0467	0,02134
X-KM TK	G	5,9200	0,02134

Звезда (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 20

Слова (А, В, С, итд.) у табели Tukey-Kramer теста указују на статистички значајне разлике између формулација хидрогелова унутар сваке специфичне временске тачке (1. дан, 7. дан, 15. дан, итд.). Групе које деле исто слово унутар једне временске тачке се не разликују значајно, док различита слова означавају статистички значајне разлике.

Групе са различитим словима (нпр. X-KM TK "А" и Blank "Е" за 1. дан) се значајно разликују једна од друге. Протоком времена, „стратификација“ постаје јаснија (више различитих слова = више група које се разликују). Највеће промене проводљивости током времена показали су узорци означени са X-KP CT, X-KM TK и X-KM CT. Ово сугерише да одређене методе синтезе хидрогелова воде до већег ослобађања или миграције јона кроз матрицу хидрогела.

Blank и X-KP TK често имају најниже вредности – што се очекује за „чисте“ или мање обрађене узорке будући да садрже мање растворљивих јона или имају гушћу матрицу која је мање пропустљива за јоне. Протоком времена у неким узорцима (нпр. X-KP CT) проводљивост континуално расте, док се у другим стабилизује или чак смањује, што може бити последица испирања мобилних јона или промена у структури матрице.

На основу статистички значајних разлика могуће је закључити да се електрична проводљивост може контролисати оптимизацијом услова припреме и састава хидрогела. Тест дугорочне стабилности (12 месеци) показао је да су одређене формулације одржавале или чак повећавале проводљивост током времена, што је изузетно вредно за индустријске или биомедицинске примене где је потребна трајна функционалност. Узорци X-KP CT и X-KM CT се могу издвојити као најбољи избор за примене где је потребна висока и стабилна електрична проводљивост током времена. Резултати статистичке анализе потврђују да избор наночестица има пресудан утицај на електричну проводљивост синтетисаних хидрогелова. Најефикасније варијанте (X-KP CT, X-KM CT, X-KM TK) су показале високу и трајну проводљивост, што их издваја као водеће кандидате за даљи развој формулација где су електричне перформансе неопходне. Следећи корак у развоју ових материјала требало би да буде тестирање функционалности у реалним условима, као и детаљна анализа механизма повећања проводљивости (нпр. анализа јонског састава, микроструктуре и дифузије).



Анализирани су ефекти ектраката и AgNPs-E, изолованих и синтетисаних различитим техникама и под различитим условима (X-КМ, X-КМ ТК, X-КМ СТ, X-КР, X-КР ТК, X-КР СТ), на промену електричне проводљивости хидрогелова током једногодишњег складиштења на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Испуњена су сва три услова за примену ANOVA теста и резултати показују да су разлике између испитиваних група статистички значајне у свим временским тачкама (таб. 29). *Post hoc* тест је показао диференцијацију међу хидрогеловима већ након једног дана, али су ове разлике биле најизраженије током дужег периода складиштења (таб. 29).

Табела 29. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) параметара електричне проводљивости за хидрогелове складиштене на тамном и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ током периода од годину дана

Поредок од 1 до 1000 у дана						
Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадартга	F- однос	p-вредност
1	Хидрогел	6	0,1932	0,03220	25,517 0	<0,0001*
	Грешка	14	0,01767	0,00126		
	Укупно	20	0,21087			
7	Хидрогел	6	0,28898	0,04816	52,678 8	<0,0001*
	Грешка	14	0,01280	0,00091		
	Укупно	20	0,30178			
15	Хидрогел	6	0,09326	0,01554	20,528 3	<0,0001*
	Грешка	14	0,01060	0,00076		
	Укупно	20	0,10386			
45	Хидрогел	6	0,85079	0,14180	106,34 88	<0,0001*
	Грешка	14	0,01867	0,00133		
	Укупно	20	0,86946			
60	Хидрогел	6	15,20016	2,53336	2198,3 710	<0,0001*
	Грешка	14	0,01613	0,00115		
	Укупно	20	15,21630			
90	Хидрогел	6	3,60746	0,60124	747,10 65	<0,0001*
	Грешка	14	0,01127	0,00081		
	Укупно	20	3,61872			
180	Хидрогел	6	16,43746	2,73958	2891,0 100	<0,0001*
	Грешка	14	0,01327	0,00095		
	Укупно	20	16,45072			
365	Хидрогел	6	1,10866	0,18478	133,34 36	<0,0001*
	Грешка	14	0,01940	0,00139		
	Укупно	20	1,12806			
Connecting Letters Report						
Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност		Стандардна грешка	
1	X-KM TK	A	6,9767		0,02051	
	X-KM CT	A	6,9433		0,02051	
	X-KP CT	A B	6,8867		0,02051	
	X-KP	B C	6,8067		0,02051	
	X-KP TK	C	6,7767		0,02051	
	X-KM	C	6,7267		0,02051	
	Blank	C	6,7167		0,02051	
7	Blank	A	6,8033		0,01746	
	X-KM CT	A	6,8033		0,01746	
	X-KP CT	A	6,7667		0,01746	
	X-KM TK	A	6,7467		0,01746	
	X-KP TK	B	6,6033		0,01746	
	X-KP	B C	6,5500		0,01746	



	X-KM	C	6,5033	0,01746
	Blank	A	6,6800	0,01589
	X-KM TK	A	6,6333	0,01589
	X-KP TK	A B	6,6067	0,01589
	X-KM CT	A B	6,6033	0,01589
	X-KP	B C	6,5433	0,01589
	X-KM	C	6,4967	0,01589
	X-KP CT	C	6,4867	0,01589
	X-KP TK	A	6,7133	0,02108
	X-KP CT	A	6,7100	0,02108
	X-KM	A B	6,6300	0,02108
	X-KM TK	A B	6,6300	0,02108
	Blank	B	6,6033	0,02108
	X-KP	C	6,3567	0,02108
	X-KM CT	D	6,1267	0,02108
	X-KP TK	A	6,7133	0,02108
	X-KP CT	A	6,7100	0,02108
	X-KM	A B	6,6300	0,02108
	X-KM TK	A B	6,6300	0,02108
	Blank	B	6,6033	0,02108
	X-KP	C	6,3567	0,02108
	X-KM CT	D	6,1267	0,02108
	X-KM	A	6,6033	0,01960
	X-KM TK	A	6,5500	0,01960
	X-KP TK	B	6,4200	0,01960
	X-KP CT	B	6,4033	0,01960
	Blank	C	5,2033	0,01960
	X-KP	D	4,6767	0,01960
	X-KM CT	E	4,5767	0,01960
	Blank	A	6,6500	0,01638
	X-KM TK	A	6,6433	0,01638
	X-KP	B	6,5467	0,01638
	X-KP CT	B	6,5033	0,01638
	X-KM	C	6,3233	0,01638
	X-KP TK	D	5,8300	0,01638
	X-KM CT	E	5,5000	0,01638
	X-KM	A	6,5967	0,01777
	X-KM TK	A	6,5533	0,01777
	X-KP TK	B	6,4167	0,01777
	X-KP CT	B	6,4033	0,01777
	Blank	C	5,0367	0,01777
	X-KM CT	D	4,5833	0,01777
	X-KP	D	4,5767	0,01777
	X-KM TK	A	6,6767	0,02149
	Blank	B	6,5333	0,02149
	X-KM	C	6,4233	0,02149
	X-KM CT	C	6,4233	0,02149
	X-KP	D	6,2800	0,02149
	X-KP TK	E	6,0767	0,02149
	X-KP CT	E	5,9767	0,02149

Звезда (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 20

Значајне разлике између хидрогелова долазе до изражаја након 45. дана, а посебно након 60, 90, 180 и 365. дана, када су групе раздвојене на неколико нивоа (A, B, C, D, E). Ова диверзификација указује на то да утицај састава хидрогела постаје још израженији током дужег периода складиштења на $T = 4$ °C. Након 60. дана, хидрогелови X-KM, X-KM TK, X-KP TK и X-KP CT показују највише средње вредности проводљивости и чине посебну групу (A и B), док је Blank значајно нижи (C), а X-KP и X-KM CT се истичу као најнижи (D и E). Овај тренд се одржава током 90 и 180 дана, што указује на то да су одређени хидрогелови успешније задржали своју структурну и



функционалну стабилност на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, док су други (посебно X-КМ СТ и X-КР) брзо губили проводљивост. Након 365. дана, X-КМ ТК је остао статистички највиши (А), док су Blank и X-КМ и даље били у релативно високим групама (В, С), док су X-КР ТК и X-КР СТ показали најниже вредности (Е). Ови резултати указују на то да X-КМ ТК хидрогел поседује изузетну дугорочну стабилност на ниској температури складиштења.

Утицај температуре складиштења. Поређењем са резултатима складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, може се приметити да складиштење на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ успорава процесе деградације и губитка електричне проводљивости, што се и очекује с обзиром на несумњиву термодинамичку основу процеса дестабилизације хидрогелова. Међутим, очигледно је да састав хидрогела има израженији ефекат од саме температуре, посебно у дужем периоду. Узимајући у обзир обе температуре складиштења, у случају Blank узорка деградација је била израженија, док су одређени хидрогелови (X-КМ ТК, X-КР ТК, X-КР СТ) задржали значајно већу проводљивост, што потврђује важност правилног избора формулације и третмана у очувању функционалних својстава.

На основу представљених резултата, може се закључити да је одабир екстраката и наночестица за формирање хидрогелова играо кључну улогу у очувању електричне проводљивости током складиштења на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Хидрогел X-КМ ТК показао је најбољу дугорочну стабилност, што га чини најперспективнијим за даље примене где је неопходно очување функционалних својстава, током дужег периода и на ниским температурама.

Практична вредност ових резултата огледа се у могућности оптимизације састава и процеса припреме хидрогела за потребе индустрије (фармација, биомедицина, итд.), где су стабилност и очување својстава током складиштења од кључног значаја.

Сва три захтева за примену ANOVA су испуњена у погледу утицаја температуре на проводљивост хидрогелова (Прилог). Резултати су показали да је средња вредност електричне проводљивости на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ била $6,44 \pm 0,04$ и $6,35 \pm 0,04$, респективно. Ови резултати указују да под тестираним условима промена температуре складиштења са $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ не доводи до статистички значајне промене електричне проводљивости узорака (таб. 30). Иако се може уочити тренд повећања проводљивости са повећањем температуре, разлика није довољно изражена да би била статистички значајна.



Табела 30. Резултати ANOVA анализе за електричну проводљивост хидрогелова током годишњег складиштења

Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
Температура	1	0,72987	0,729868	2,1689	0,1418
Грешка	334	112,39740	0,336519		
Укупно	335	113,12727			

Практично, ово указује да електрична проводљивост остаје релативно стабилна у тестираном температурном опсегу, што може бити важно за дугорочно складиштење и транспорт хидрогелова. Могући разлог за одсуство статистички значајне разлике може бити ограничен температурни опсег или физичко-хемијска својства тестираних материјала која нису посебно осетљива на тако мале температурне промене. У сваком случају, тестиране температуре су изабране са становишта практичности и најчешће коришћених услова складиштења.

4.4.2 Физичко-хемијске карактеристике хидрогелова са наночестицама злата

4.4.2.1 Вискозност хидрогелова са наночестицама злата

Хидрогелови формиран са наночестицама злата су показали задовољавајуће вредности вискозности која се показала релативно стабилном, тако да се могу потенцијално користити у козметичким препаратима. Вискозност хидрогелова са AuNPs-E је мерена током једногодишњег складиштења на две температуре, како је горе описано. У табели 31 су дати резултати мерења промене вискозности на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Табела 31. Вискозност blank хидрогела, хидрогелова са екстрактима листа купине добијеним мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс и хидрогелова са AuNPs-E синтетисаним наведеним екстрактима на собној температури и температури кључања. Узорци су складиштени у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током једне године

Вискозност [Pa·s]										
	Време (дан)	2	8	16	30	65	98	120	150	365
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	8,92±0,2	8,95±0,15	8,97±0,25	8,93±0,15	8,96±0,15	8,94±0,3	8,95±0,15	8,94±0,51	8,94±0,25
	X-KM CT	8,96±0,25	8,94±0,21	8,96±0,25	8,93±0,3	8,96±0,26	8,95±0,3	8,93±0,15	8,93±0,26	8,94±0,31
	X-KM 80	8,94±0,25	8,95±0,21	8,93±0,31	8,95±0,21	8,92±0,25	8,94±0,15	8,95±0,20	8,91±0,50	8,96±0,35
	X-KP CT	8,95±0,15	8,94±0,25	8,95±0,21	8,94±0,10	8,95±0,31	8,95±0,25	8,94±0,31	8,94±0,25	8,95±0,21
	X-KP 80	8,93±0,15	8,92±0,21	8,95±0,25	8,94±0,21	8,93±0,21	8,95±0,3	8,96±0,21	8,94±0,15	8,95±0,25
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	X-KM CT	8,95±0,15	8,94±0,15	8,93±0,21	8,95±0,26	8,94±0,35	8,93±0,41	8,94±0,2	8,94±0,31	8,96±0,35
	X-KM 80	8,95±0,25	8,94±0,15	8,92±0,26	8,95±0,36	8,96±0,25	8,94±0,15	8,92±0,25	8,96±0,47	8,94±0,31
	X-KP CT	8,94±0,25	8,95±0,31	8,95±0,26	8,95±0,32	8,94±0,15	8,94±0,30	8,96±0,35	8,95±0,31	8,93±0,21
	X-KP 80	8,94±0,25	8,93±0,38	8,96±0,15	8,95±0,32	8,93±0,25	8,95±0,36	8,96±0,35	8,95±0,26	8,92±0,3
	Blank – хидрогел без наночестица и екстракта X-KM CT – хидрогел са AuNPs-E синтетисаним мацератом купине на собној T X-KM 80 – хидрогел са AuNPs-E синтетисаним мацератом купине на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ X-KP CT – хидрогел са AuNPs-E синтетисаним екстрактном уз рефлукс купине на собној T X-KP 80 – хидрогел са AuNPs-E синтетисаним екстрактном уз рефлукс купине на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$									



Добијени хидрогелови су били полуврсти, а додавање наночестица злата је изазвало благо повећање привидне вискозности, што је био случај и са хидрогеловима који садрже наночестице сребра (Tasić et al., 2026). Током складиштења у трајању од 12 месеци на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, у мраку, примећене су мање варијације у вискозности. Слично хидрогеловима који садрже наночестице сребра, ове флукуације су биле минималне и нису значајно утицале на укупна својства формулација. Стабилност свих узорака је одржана током целог периода складиштења. Штавише, уградња наночестица злата није утицала на вискозност матрице хидрогела, што одражава понашање примећено код узорака са уграђеним наночестицама сребра у поређењу са контролним гелом без наночестица.

Утицај типа хидрогела и времена инкубације на вискозност испитиван је у различитим временским интервалима (2, 8, 16, 30, 65, 98, 120, 150 и 365 дана) применом једнофакторске варијансе (ANOVA), као што је описано код хидрогелова са наночестицама сребра. На исти начин је за сваку временску тачку анализирана статистички значајна разлика између различитих типова хидрогелова. У овом случају резултати су показали да не постоји статистички значајна разлика у вискозности између испитиваних група, у било ком временском интервалу. У табели 32 су приказани резултати ANOVA анализе параметара вискозности испитиваних хидрогелова.

Табела 32. ANOVA анализа параметара вискозности за хидрогелове са AuNPs-E складиштене на тамном, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током периода од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$						
2	Хидрогел	4	0,00309	0,00077	0,8992	0,4998
	Грешка	10	0,00860	0,00086		
	Укупно	14	0,01169			
8	Хидрогел	4	0,00173	0,00043	0,3368	0,8471
	Грешка	10	0,01287	0,00129		
	Укупно	14	0,01460			
16	Хидрогел	4	0,00344	0,00086	0,4905	0,7432
	Грешка	10	0,01753	0,00175		
	Укупно	14	0,02097			
30	Хидрогел	4	0,00043	0,00011	0,0690	0,9899
	Грешка	10	0,01547	0,00155		
	Укупно	14	0,01589			
65	Хидрогел	4	0,00357	0,00089	0,9926	0,4549
	Грешка	10	0,00900	0,00090		
	Укупно	14	0,01257			
98	Хидрогел	4	0,00020	0,00005	0,0466	0,9952
	Грешка	10	0,01073	0,00107		
	Укупно	14	0,01093			
120	Хидрогел	4	0,00151	0,00038	0,1220	0,9713
	Грешка	10	0,03087	0,00309		
	Укупно	14	0,03237			
365	Хидрогел	4	0,00084	0,00021	0,1529	0,9573



	Грешка	10	0,01373	0,00137		
	Укупно	14	0,01457			
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$						
2	Хидрогел	3	0,00020	0,00007	0,1538	0,9243
	Грешка	8	0,00347	0,00043		
	Укупно	11	0,00367			
8	Хидрогел	3	0,00060	0,00020	0,2727	0,8435
	Грешка	8	0,00587	0,00073		
	Укупно	11	0,00647			
16	Хидрогел	3	0,00282	0,00094	1,3452	0,3267
	Грешка	8	0,00560	0,00070		
	Укупно	11	0,00842			
30	Хидрогел	3	0,00010	0,00003	0,0217	0,9953
	Грешка	8	0,01227	0,00153		
	Укупно	11	0,01237			
65	Хидрогел	3	0,00156	0,00052	0,3425	0,7956
	Грешка	8	0,01213	0,00152		
	Укупно	11	0,01369			
98	Хидрогел	3	0,00042	0,00014	0,1619	0,9190
	Грешка	8	0,00700	0,00087		
	Укупно	11	0,00742			
120	Хидрогел	3	0,00289	0,00096	0,6764	0,5905
	Грешка	8	0,01140	0,00142		
	Укупно	11	0,01429			
365	Хидрогел	3	0,00376	0,00125	0,6480	0,6059
	Грешка	8	0,01547	0,00193		
	Укупно	11	0,01922			

4.4.2.2 рН вредности хидрогелова са наночестицама злата

Мерења рН вредности припремљених хидрогелова са AuNPs-E, приказаних у табели 33, показују њихову стабилност током периода складиштења. Овај параметар је посебно релевантан јер формулације намењене за локалну примену морају да одржавају рН вредност компатибилну са кожом. Забележене рН вредности су се кретале од $4,89 \pm 0,04$ до $5,74 \pm 0,03$, што спада у прихватљиви опсег за дермалну употребу. Табела 33 пружа упоредни преглед стабилности рН вредности под различитим условима складиштења, тј. на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Табела 33. Вредности рН blank хидрогела, хидрогелова са екстрактима листа купине добијеним мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс и хидрогелова са AuNPs-E синтетисаним наведеним екстрактима на собној температури и температури кључања. Узорци складиштени у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током једне године

		рН вредност								
	Време (дани)	2	8	16	30	65	98	120	150	365
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Blank	5,45 $\pm$ 0,03	5,04 $\pm$ 0,02	5,00 $\pm$ 0,02	5,04 $\pm$ 0,03	4,98 $\pm$ 0,03	5,22 $\pm$ 0,02	5,35 $\pm$ 0,03	5,03 $\pm$ 0,03	5,40 $\pm$ 0,01
	X-KM CT	5,31 $\pm$ 0,04	5,41 $\pm$ 0,03	5,32 $\pm$ 0,03	5,27 $\pm$ 0,02	5,51 $\pm$ 0,02	5,62 $\pm$ 0,02	5,61 $\pm$ 0,03	5,58 $\pm$ 0,03	4,89 $\pm$ 0,04
	X-KM 80	5,35 $\pm$ 0,03	5,41 $\pm$ 0,02	5,36 $\pm$ 0,02	5,34 $\pm$ 0,03	5,51 $\pm$ 0,03	5,46 $\pm$ 0,03	5,58 $\pm$ 0,03	5,59 $\pm$ 0,05	4,96 $\pm$ 0,03
	X-KP CT	5,30 $\pm$ 0,03	5,40 $\pm$ 0,03	5,32 $\pm$ 0,03	5,32 $\pm$ 0,03	5,55 $\pm$ 0,03	5,57 $\pm$ 0,03	5,60 $\pm$ 0,03	5,58 $\pm$ 0,04	4,94 $\pm$ 0,03
	X-KP 80	5,27 $\pm$ 0,02	5,33 $\pm$ 0,03	5,27 $\pm$ 0,02	5,24 $\pm$ 0,04	5,45 $\pm$ 0,03	5,47 $\pm$ 0,04	5,46 $\pm$ 0,03	5,52 $\pm$ 0,04	4,90 $\pm$ 0,02
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	X-KM CT	5,39 $\pm$ 0,02	5,56 $\pm$ 0,05	5,36 $\pm$ 0,06	5,37 $\pm$ 0,02	5,59 $\pm$ 0,03	5,65 $\pm$ 0,03	5,45 $\pm$ 0,02	5,60 $\pm$ 0,05	5,12 $\pm$ 0,04
	X-KM 80	5,34 $\pm$ 0,02	5,41 $\pm$ 0,05	5,30 $\pm$ 0,04	5,41 $\pm$ 0,02	5,49 $\pm$ 0,01	5,61 $\pm$ 0,05	5,45 $\pm$ 0,03	5,56 $\pm$ 0,04	5,07 $\pm$ 0,05
	X-KP CT	5,30 $\pm$ 0,02	5,74 $\pm$ 0,03	5,27 $\pm$ 0,04	5,34 $\pm$ 0,02	5,54 $\pm$ 0,04	5,58 $\pm$ 0,04	5,55 $\pm$ 0,03	5,59 $\pm$ 0,05	5,02 $\pm$ 0,04
	X-KP 80	5,42 $\pm$ 0,04	5,59 $\pm$ 0,03	5,44 $\pm$ 0,02	5,42 $\pm$ 0,05	5,54 $\pm$ 0,02	5,67 $\pm$ 0,03	5,48 $\pm$ 0,03	5,55 $\pm$ 0,02	5,18 $\pm$ 0,03

Скраћенице су дате у табели 31



Као у случају хидрогелова са наночестицама сребра, и за хидрогелове са наночестицама злата је урађена статистичка евалуација једнофакторске анализе (ANOVA) и Tukey-Kramer *post hoc* тест у циљу потврде значајности варијације pH вредности између различитих хидрогелова у неколико различитих тачака. Добијени статистички резултати су приказани у табели 34.

Пре спровођења анализе тестирани су услови и када је утврђено да су услови задовољени, спроведена је анализа варијансе (ANOVA). На основу анализе варијансе, при чему је p вредност била мања од било ког нивоа значајности на свим временским интервалима (таб. 34), установљено је да постоји разлика средњих pH вредности између хидрогелова. Да би се утврдило између којих хидрогелова постоји разлика, спроведена је *post hoc* Tukey-Kramer анализа чији су резултати представљени словним тестом у табели 34 (Connecting Letters Report).

Табела 34. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) pH параметара за хидрогелове са AuNPs-E складиштене на тамном и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ током периода од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p -вредност
2	Хидрогелови	4	0,05656	0,01414	16,1908	0,0002*
	Грешка	10	0,00873	0,00087		
	Укупно	14	0,06529			
8	Хидрогелови	4	0,29407	0,07352	98,4598	<0,0001*
	Грешка	10	0,00747	0,00075		
	Укупно	14	0,30153			
16	Хидрогелови	4	0,25989	0,06497	94,6214	<0,0001*
	Грешка	10	0,00687	0,00069		
	Укупно	14	0,26676			
30	Хидрогелови	4	0,16897	0,04224	33,8850	<0,0001*
	Грешка	10	0,01247	0,00125		
	Укупно	14	0,18144			
65	Хидрогелови	4	0,66896	0,16724	158,7722	<0,0001*
	Грешка	10	0,01053	0,00105		
	Укупно	14	0,67949			
98	Хидрогелови	4	0,28563	0,07141	77,0576	<0,0001*
	Грешка	10	0,00927	0,00093		
	Укупно	14	0,29689			
120	Хидрогелови	4	0,15136	0,03784	33,9880	<0,0001*
	Грешка	10	0,01113	0,00111		
	Укупно	14	0,16249			
150	Хидрогелови	4	0,70871	0,17718	191,1978	<0,0001*
	Грешка	10	0,00927	0,00093		
	Укупно	14	0,71797			
365	Хидрогелови	4	0,55551	0,13888	130,1969	<0,0001*
	Грешка	10	0,01067	0,00107		
	Укупно	14	0,56617			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
2	Blank	A	5,4500	0,01706
	X-KM 80	B	5,3500	0,01706
	X-KM CT	B	5,3100	0,01706
	X-KP CT	B	5,3033	0,01706
	X-KP 80	B	5,2733	0,01706
8	X-KM 80	A	5,4100	0,01578
	X-KM CT	A	5,4067	0,01578
	X-KP CT	A B	5,3967	0,01578
	X-KP 80	B	5,3267	0,01578



	Blank	C	5,0433	0,01578
16	X-KM 80	A	5,3567	0,01513
	X-KM CT	A B	5,3233	0,01513
	X-KP CT	A B	5,3233	0,01513
	X-KP 80	B	5,2700	0,01513
	Blank	C	4,9967	0,01513
30	X-KM 80	A	5,3367	0,02039
	X-KP CT	A	5,3167	0,02039
	X-KM CT	A	5,2733	0,02039
	X-KP 80	A	5,2433	0,02039
	Blank	B	5,0400	0,02039
65	X-KP CT	A	5,5467	0,01874
	X-KM 80	A B	5,5133	0,01874
	X-KM CT	A B	5,5133	0,01874
	X-KP 80	B	5,4467	0,01874
	Blank	C	4,9833	0,01874
98	X-KM CT	A	5,6233	0,01758
	X-KP CT	A	5,5733	0,01758
	X-KP 80	B	5,4700	0,01758
	X-KM 80	B	5,4567	0,01758
	Blank	C	5,2233	0,01758
120	X-KM CT	A	5,6167	0,01926
	X-KP CT	A	5,6033	0,01926
	X-KM 80	A	5,5767	0,01926
	X-KP 80	B	5,4633	0,01926
	Blank	C	5,3533	0,01926
150	X-KM 80	A	5,5867	0,01758
	X-KP CT	A	5,5833	0,01758
	X-KM CT	A	5,5767	0,01758
	X-KP 80	A	5,5200	0,01758
	Blank	B	5,0267	0,01758
365	Blank	A	5,3967	0,01886
	X-KM 80	B	4,9567	0,01886
	X-KP CT	B	4,9400	0,01886
	X-KP 80	B	4,8967	0,01886
	X-KM CT	B	4,8867	0,01886

Звездика (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 31

На основу *post hoc* Tukey-Kramer теста јасно се могу уочити разлике у рН вредностима између анализираних хидрогелова. Након другог дана Blank је супериоран у односу на све третмане (разлике $\approx 0,10 - 0,18$), што имплицира да у врло раној фази евентуалне предности модификованих хидрогелова још нису изражене или су чак потиснуте. Од 8. до 30. дана сви третмани надмашују Blank; разлике унутар третмана су мале и често статистички незначајне, уз благу предност X-KM 80 и X-KM CT на 8 – 16 дана. У средњем прозору (65 – 150 дана) формира се плато високих вредности са највишим средњим вредностима за CT варијанте (X-KM CT/X-KP CT), а X-KP CT достиже пик на 65 дана. У овом домену разлике према Blank достижу $\approx 0,46 - 0,56$, вишеструко преко резидуалне варијансе (RMSE 0,03), што указује на снажан и практично важан ефекат. Након 365 дана долази до инверзије: Blank је поново највиши, а сви третмани су уједначено нижи за $\approx 0,44 - 0,51$. Ова обрнутост ранга потврђује да је временска динамика пресудна за интерпретацију и препоруку третмана.

Екстракти листова купине обилују полифенолима (танини, флавоноиди, фенолне киселине) који у зеленој синтези имају двоструку улогу: редукују Au^{3+} у Au^0 и



„облажу“ настале AuNPs (Alegria et al., 2018). Промена рН вредности може се разумети као резултат три процеса чији се релативни допринос мења током времена: рана фаза (2 дана) – „киселински отисак“ екстракта; непосредно након инкорпорације у гелу остају слободне фенолне/карбоксилне групе и ниско-молекулске киселине из екстракта (Żurek and Adamczyk, 2025). Оне обарају рН третираних узорака у односу на Blank. Варијанте добијене рефлуксом (КР) имају већи удео хидролизованых танина и фенолних киселина, а синтеза на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (80) повећава екстракцију и трансформацију полифенола – оба фактора доприносе нижем иницијалном рН у третманима. Друга фаза је интермедијарна фаза (8 – 150 дана) – стабилизација површинског омотача и пуферска реорганизација (El-Seedi et al., 2024). Како гел сазрева, полифенолни слој на AuNPs се згушњава и реорганизује (секундарне интеракције, водоничне везе, хидрофобно паковање), чиме се смањује доступност киселих функционалних група и њихов допринос слободној киселости. Паралелно, део фенола се додатно веже на површину злата или на мрежу гела, што повећава рН (Huang et al., 2023). Синтеза на собној температури даје спорију нуклеацију и дебљи, функционално разноликији омотач, па су Х-КМ СТ и Х-КР СТ у просеку рН-виши од одговарајућих 80 парова; Х-КР СТ достиже максимум око 65. дана, што је у складу са богатијим и реактивнијим фенолним профилем добијеним екстракцијом уз рефлукс, а при блажим условима синтезе наночестица. Трећа фаза - касна фаза (365 дана) – оксидативна трансформација слоја и ацидификација (Mikhailova, 2021). Иако је злато хемијски инертније од сребра и не очекује се „цурење“ Ау-јона, AuNPs су каталитички активне површине за благе оксидације фенола у присуству кисеоника. Спора оксидација полифенола (настанак хинонских структура и нижих органских киселина), као и могућа хидролиза естарских веза у мрежи, производе киселе продукте и обарају рН (Geng et al., 2023). Тиме се може објаснити конвергенција свих третмана на ниже рН вредности наспрам Blank-а након годину дана.

Генерално, комбинација извора екстракта (КМ/КР), режима синтезе (СТ/80) и времена складиштења генерише нелинеаран, али репродуктиван рН профил: краткотрајно обарање рН вредности, широк плато повишења, па касна ацидификација.

Утицај извора екстракта и температуре синтезе. КМ (мацерација)/КР (рефлукс). Екстракцијом уз рефлукс добијају се екстракти са већим уделом хидролизованых танина и фенолних киселина, погодних за стабилније „затварање“ AuNPs; то се огледа код Х-КР СТ при врхунцу око 65. дана и задржавању повишеног рН до ~120 – 150 дана.



Синтеза СТ/80. Синтеза на СТ фаворизује дебљи и хетерогенији органски слој, која средњерочно боље „упија“ или блокира киселе функционалне групе; стога Х-КМ СТ и Х-КР СТ конзистентно надмашују (80) парове у интервалу 8 – 150 дана. Синтеза на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ даје компактније честице и бржу потпуну редукцију, али без истог рН бенефита у средњем периоду.

Практичне импликације за дизајн хидрогелова са AuNPs

Прозор примене. Ако је циљ повишен/стабилан рН у 8 – 150 дана, предност имају СТ варијанте, уз наглашену ефикасност Х-КР СТ у средини тог прозора (таб. 35).

Дугорочна употреба (~365 дана). Сви третмани показују ацидификацију наспрам Blank-а; за продужене периоде примене потребан је антиоксидативни или пуферски дизајн (нпр. ко-капирање („затварање“) полисахаридом/PEG-ом, уградња благог пуфера, хватача ROS или феноксилних радикала) (Fan et al., 2025).

Контролисана хемија омотача. Модулисање односа фенолна киселина: кондензовани танин и пост-синтетско „испирање“ слободних киселих компоненти могу померити оптимум и ублажити касни пад рН (Zvereva et al., 2026).

Табела 35. ANOVA анализа и Tukey-Kramer тест (Connecting Letters Report) рН параметара за хидрогелове са AuNPs-Е складиштене на тамном и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, у периоду од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
2	Хидрогелови	4	0,04253	0,01063	12,5591	0,0007*
	Грешка	10	0,00847	0,00085		
	Укупно	14	0,05100			
8	Хидрогелови	4	0,83604	0,20901	407,1623	<0,0001*
	Грешка	10	0,00513	0,00051		
	Укупно	14	0,84117			
16	Хидрогелови	4	0,33331	0,08333	87,4056	<0,0001*
	Грешка	10	0,00953	0,00095		
	Укупно	14	0,34284			
30	Хидрогелови	4	0,29943	0,07486	109,0146	<0,0001*
	Грешка	10	0,00687	0,00069		
	Укупно	14	0,30629			
65	Хидрогелови	4	0,76327	0,19082	344,8494	<0,0001*
	Грешка	10	0,00553	0,00055		
	Укупно	14	0,76880			
98	Хидрогелови	4	0,40217	0,10054	186,1914	<0,0001*
	Грешка	10	0,00540	0,00054		
	Укупно	14	0,40757			
120	Хидрогелови	4	0,05863	0,01466	20,7406	<0,0001*
	Грешка	10	0,00707	0,00071		
	Укупно	14	0,06569			
150	Хидрогелови	4	0,73551	0,18388	181,4572	<0,0001*
	Грешка	10	0,01013	0,00101		
	Укупно	14	0,74654			
365	Хидрогелови	4	0,29027	0,07257	8,7500	<0,0026*
	Грешка	10	0,08293	0,00829		
	Укупно	14	0,37320			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
-------------	------	-------	-----------------	-------------------



2	Blank	A	5,4500	0,01680
	X-KP 80	A	5,4167	0,01680
	X-KM CT	A B	5,3933	0,01680
	X-KM 80	B C	5,3367	0,01680
	X-KP CT	C	5,3033	0,01680
8	X-KP CT	A	5,7367	0,01308
	X-KP 80	B	5,5867	0,01308
	X-KM CT	B	5,5633	0,01308
	X-KM 80	C	5,4133	0,01308
	Blank	D	5,0433	0,01308
16	X-KP 80	A	5,4367	0,01783
	X-KM CT	A B	5,3567	0,01783
	X-KM 80	B C	5,3033	0,01783
	X-KP CT	C	5,2667	0,01783
	Blank	D	4,9967	0,01783
30	X-KP 80	A	5,4167	0,01513
	X-KM 80	A B	5,4133	0,01513
	X-KM CT	A B	5,3733	0,01513
	X-KP CT	A B	5,3433	0,01513
	Blank	C	5,0400	0,01513
65	X-KM CT	A	5,5933	0,01358
	X-KP 80	A B	5,5433	0,01358
	X-KP CT	A B	5,5367	0,01358
	X-KM 80	B	5,4933	0,01358
	Blank	C	4,9833	0,01358
98	X-KP 80	A	5,6667	0,01342
	X-KM CT	A	5,6467	0,01342
	X-KM 80	A B	5,6100	0,01342
	X-KP CT	B	5,5800	0,01342
	Blank	C	5,2233	0,01342
120	X-KP CT	A	5,5467	0,01535
	X-KP 80	A B	5,4833	0,01535
	X-KM 80	A B	5,4533	0,01535
	X-KM CT	B	5,4500	0,01535
	Blank	C	5,3533	0,01535
150	X-KM CT	A	5,6033	0,01838
	X-KP CT	A	5,5933	0,01838
	X-KM 80	A	5,5633	0,01838
	X-KP 80	A	5,5533	0,01838
	Blank	B	5,0267	0,01838
365	Blank	A	5,3967	0,05258
	X-KP 80	A B	5,2833	0,05258
	X-KM CT	B C	5,1233	0,05258
	X-KM 80	B C	5,0733	0,05258
	X-KP CT	B C	5,0233	0,05258

Звездича (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 31

Анализом резултата уочава се јасна динамика ефекта третмана: краткорочно (до 2. дана) када је контрола конкурентна или чак боља од појединих третмана; рано-средњи период (8 – 150 дана) у коме третмани остварују јасну предност над контролом, уз статистички значајне разлике које су најизраженије између 98. и 150. дана; дугорочно (365 дана) када се предност третмана губи, а контрола поново показује стабилизацију и прелазак у вишу статистичку подгрупу.

Ови резултати указују на постојање одложене ефикасности третмана, која се манифестује у средњем периоду, али је дугорочно пролазна. За практичну примену то значи да третмани могу имати значајан ефекат у оквиру неколико месеци, док њихова дугорочна одрживост није потврђена. Такав образац сугерише да механизам деловања



третмана има ограничен временски домет и вероватно зависи од специфичних физиолошких и биохемијских адаптација које временом слабе.

За разлику од електричне проводљивости (видети доле), где третмани дугорочно задржавају или повећавају предност (посебно на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$), код рН вредности ефекти хидрогела су пролазни: најизраженији су између 30. и 150. дана, док се након 365 дана Blank стабилизује и достиже највиши ниво. Ово указује да третмани са наночестицама злата имају значајан али временски ограничен утицај на јонску равнотежу и киселост система, док су промене електричне проводљивости трајније и кумулативне.

4.4.2.3 Електрична проводљивост хидрогелова са наночестицама злата

Електрична проводљивост игра кључну улогу у ћелијској сигнализацији, утичући на кључне процесе као што су ћелијска диференцијација и пролиферација. Хидрогелови са побољшаном електричном проводљивошћу могу олакшати контролисано ослобађање лекова, чиме се побољшава њихов терапеутски потенцијал. Међу различитим проводљивим адитивима, наночестице злата и сребра се најчешће користе за побољшање електричних својстава хидрогелних система (Koungkolos et al., 2023). С обзиром на то да хидрогелови показују релативно ниску електричну проводљивост, наночестице метала са високом проводљивошћу уграђују се у њихову матрицу како би се побољшала механичка и функционална својства хидрогелне мреже (Agarwala, 2020). Електрична проводљивост формулација чуваних на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ кретала се од $4,97 \pm 0,03$ до $8,26 \pm 0,02\text{ mS cm}^{-1}$, док су оне чуване на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ показивале вредности између $7,30 \pm 0,05$ и $8,35 \pm 0,04\text{ mS cm}^{-1}$ (таб. 36). Поређење између контролног гела и хидрогелова који садрже наночестице злата открива значајно ниже вредности проводљивости у контролном узорку, што потврђује да уградња наночестица побољшава електричну проводљивост услед присуства самих наночестица метала и њихових јона. Поред тога, анализа проводљивости током складиштења од 12 месеци указује на благо постепено повећање проводљивости што се може приписати спорој агрегацији наночестица и пратећим физичким и молекуларним преуређењима унутар полимерне матрице (Shin et al., 2024).

Табела 36. Електрична проводљивост blank хидрогела, хидрогелова са екстрактима купине добијеним мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс и хидрогелова са AuNPs-Е синтетисаним наведеним екстрактима на собној температури и температури кључања. Узорци складиштени у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током једне године



Електрична проводљивост [mScm^{-1}]										
Време (дани)	2	8	16	30	65	98	120	150	365	
$T = 22$ °C	Blank	6,72±0,02	6,84±0,03	6,86±0,04	6,04±0,02	5,04±0,02	6,59±0,03	4,97±0,03	6,72±0,03	6,42±0,02
	X-КМ СТ	7,68±0,02	7,48±0,04	7,85±0,03	7,93±0,02	7,96±0,02	8,07±0,03	8,02±0,04	8,01±0,04	8,23±0,04
	X-КМ 80	7,75±0,04	7,83±0,02	7,85±0,03	7,91±0,01	7,90±0,02	8,08±0,02	8,04±0,02	7,90±0,01	8,26±0,02
	X-КР СТ	7,89±0,03	7,94±0,03	7,56±0,01	7,94±0,02	7,95±0,04	7,98±0,03	7,84±0,02	7,87±0,03	7,98±0,04
$T = 4$ °C	X-КР 80	7,60±0,03	7,56±0,02	7,81±0,03	7,81±0,02	7,67±0,03	7,76±0,04	7,78±0,03	7,55±0,03	8,07±0,02
	X-КМ СТ	7,42±0,02	7,52±0,04	7,65±0,04	7,58±0,03	7,57±0,02	7,76±0,06	7,69±0,02	7,69±0,04	8,17±0,04
	X-КМ 80	7,41±0,04	7,45±0,05	7,44±0,04	7,56±0,03	7,33±0,02	7,52±0,03	7,37±0,02	7,34±0,03	7,70±0,04
	X-КР СТ	7,52±0,03	7,62±0,04	7,30±0,05	7,52±0,03	7,34±0,03	7,56±0,04	7,45±0,04	7,55±0,03	7,85±0,02
	X-КР 80	7,70±0,04	7,52±0,03	7,77±0,03	7,95±0,06	7,77±0,03	8,01±0,03	7,82±0,05	7,88±0,05	8,35±0,04

Скраћенице су дате у табели 31

Пре спровођења једнофакторске анализе варијансе (ANOVA), тестирани су услови за њену примену. Узорци су били независни, а додатно је извршена провера нормалности расподеле података коришћењем Shapiro–Wilk теста. Резултати су показали да у свим посматраним временским тачкама нема значајног одступања од нормалне расподеле ($p > 0,05$), чиме је потврђено да је претпоставка нормалности задовољена. Испитана је и хомогеност варијанси између група применом више тестова (O'Brien, Brown-Forsythe, Левене и Bartlett), при чему ниједан није указао на значајна одступања ($p > 0,05$). На основу тога, испуњени су сва три услова за валидну примену ANOVA методе.

Проводљивост хидрогелова је мерена након 2, 8, 16, 30, 65, 98, 120, 150 и 365 дана инкубације. За сваку временску тачку примењена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) у циљу процене разлика између испитиваних група (Blank, X-КМ 80, X-КМ СТ, X-КР 80 и X-КР СТ). Резултати ANOVA (таб. 37) показали су да је на свим мерним тачкама постојала изразито значајна разлика у проводљивости између хидрогелова (F вредности у распону од ~350 до преко 4600, $p < 0,0001$).

Табела 37. ANOVA анализа параметара електричне проводљивости за хидрогелове са AuNPs-E складиштене на тамном и $T = 22$ °C, у периоду од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
2	Хидрогелови	4	2,58317	0,64579	633,1307	<0,0001*
	Грешка	10	0,01020	0,00102		
	Укупно	14	2,59337			
8	Хидрогелови	4	2,19369	0,54842	741,1126	<0,0001*
	Грешка	10	0,00740	0,00074		
	Укупно	14	2,20109			
16	Хидрогелови	4	2,13204	0,53301	352,2093	<0,0001*
	Грешка	10	0,01513	0,00151		
	Укупно	14	2,14717			
30	Хидрогелови	4	8,31543	2,07886	2380,370	<0,0001*
	Грешка	10	0,00873	0,00087		
	Укупно	14	8,32416			
65	Хидрогелови	4	19,37553	4,84388	4657,580	<0,0001*
	Грешка	10	0,01040	0,00104		
	Укупно	14	19,38593			
98	Хидрогелови	4	4,78533	1,19633	1220,748	<0,0001*
	Грешка	10	0,00980	0,00098		
	Укупно	14	4,79513			



120	Хидрогелови	4	20,99129	5,24782	3123,704	<0,0001*
	Грешка	10	0,01680	0,00168		
	Укупно	14	21,00809			
150	Хидрогелови	4	3,34753	0,83688	682,2418	<0,0001*
	Грешка	10	0,01227	0,00123		
	Укупно	14	3,35980			
365	Хидрогелови	4	7,18156	1,79539	938,3571	<0,0001*
	Грешка	10	0,01913	0,00191		
	Укупно	14	7,20069			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
2	Blank	D	6,7200	0,01844
	X-KM 80	B	7,7533	0,01844
	X-KM CT	B C	7,6800	0,01844
	X-KP 80	C	7,6033	0,01844
	X-KP CT	A	7,8867	0,01844
8	Blank	E	6,8433	0,01571
	X-KM 80	B	7,8267	0,01571
	X-KM CT	B C	7,4800	0,01571
	X-KP 80	C	7,5633	0,01571
	X-KP CT		7,9400	0,01571
16	Blank	C	6,8633	0,02246
	X-KM 80	A	7,8467	0,02246
	X-KM CT	A	7,8467	0,02246
	X-KP 80	A	7,8133	0,02246
	X-KP CT	B	7,5567	0,02246
30	Blank	C	6,0400	0,01706
	X-KM 80	A	7,9100	0,01706
	X-KM CT	A	7,9300	0,01706
	X-KP 80	B	7,8067	0,01706
	X-KP CT	A	7,9433	0,01706
65	Blank	C	5,0400	0,01862
	X-KM 80	A	7,8967	0,01862
	X-KM CT	A	7,9567	0,01862
	X-KP 80	B	7,6700	0,01862
	X-KP CT	A	7,9533	0,01862
98	Blank	D	6,5900	0,01807
	X-KM 80	A	8,0767	0,01807
	X-KM CT	A	8,0767	0,01807
	X-KP 80	C	7,7633	0,01807
	X-KP CT	B	7,9833	0,01807
120	Blank	C	4,9733	0,02366
	X-KM 80	A	8,0400	0,02366
	X-KM CT	A	8,0200	0,02366
	X-KP 80	B	7,7767	0,02366
	X-KP CT	B	7,8433	0,02366
150	Blank	D	6,7167	0,02022
	X-KM 80	B	7,8967	0,02022
	X-KM CT	A	8,0133	0,02022
	X- KP 80	C	7,5500	0,02022
	X-KP CT	B	7,8733	0,02022
365	Blank	C	6,4233	0,02525
	X-KM 80	A	8,2567	0,02525
	X-KM CT	A	8,2267	0,02525
	X-KP 80	B	8,0733	0,02525
	X-KP CT	B	7,9833	0,02525

Звездица (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)

Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују

Скраћенице су дате у табели 31

Након спроведене једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) значајне разлике између испитиваних група су испитане Tukey HSD *post hoc* тестом. Резултати поређења приказани су у табели 37, где су групе обележене словима која означавају припадност хомогеним подскупинама ($p < 0,05$). Анализа показује да је у свим временским тачкама контролна група (Blank) имала статистички значајно ниже вредности проводљивости у



поређењу са другим хидрогеловима. Током целог периода праћења јасно се уочава образац: $\text{Blank} < \text{KP} < \text{KM}$, при чему су узорци X-KM 80 и X-KM CT доследно сврстани у највишу хомогену групу (слово A), док су узорци X-KP 80 и X-KP CT заузимали ниже групе, са мањим варијацијама у односу на време мерења.

У раним фазама (2. и 8. дан) уочава се већа хетерогеност, где су узорци KM и KP раздвојени у више група. Међутим, од 16. дана надаље, KM узорци (X-KM 80 и X-KM CT) стабилно се издвајају као статистички значајно проводљивији у односу на KP узорке и контролу. На 120. и 365. дан KM узорци остају у највишој групи (A), док су KP узорци сврстани у средње групе (B), а контрола увек у најнижој групи (C, D или E).

Посебно се истиче 150. дан, када је дошло до делимичног преклапања група, тј. X-KM CT се сврстава у највишу групу (A), док су X-KM 80 и X-KP CT подељени између група A и B, што указује на привремену конвергенцију вредности између ових узорака.

Резултати потврђују доследан и стабилан тренд: примена наночестица значајно повећава проводљивост хидрогелова у односу на контролу, при чему су KM узорци најефикаснији, док су KP узорци показивали умерено повећање.

Што се тиче анализе узорака складиштених на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, пре спровођења једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) проверени су услови за њену примену, што је показало да су узорци независни. Нормалност расподеле претпостављена је као у аналогној анализи на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, док је хомогеност варијанси проверена са више тестова (O'Brien, Brown–Forsythe, Levene, Bartlett); ни у једној тачки није уочено значајно одступање ($p > 0,05$). Као робусна провера, израчуната је и Welch ANOVA, која је такође показала значајне разлике међу групама ($p < 0,01$ или мање). Тиме су задовољени услови за валидну примену ANOVA методе.

Проводљивост хидрогелова је мерена у девет временских тачака. За сваку тачку примењена је једнофакторска ANOVA ради процене разлика између група (X-KM 80, X-KM CT, X-KP 80, X-KP CT).

Резултати ANOVA (таб. 38) показују да у свим тачкама постоји изразито значајна разлика у проводљивости између хидрогелова (F од ~ 23 до ~ 246 ; $p \leq 0,0003$).

Табела 38. ANOVA анализа параметара електричне проводљивости за хидрогелове са AuNPs-E складиштене на тамном и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, у периоду од годину дана

Време (дан)	Извор	DF	Сума квадрата	Средња вредност квадрата	F-однос	p-вредност
8	Хидрогелови	3	0,04767	0,01589	22,6984	0,0003*
	Грешка	8	0,00560	0,00070		
	Укупно	11	0,05327			



16	Хидрогелови	3	0,38830	0,12943	125,2581	<0,0001*
	Грешка	8	0,00827	0,00103		
	Укупно	11	0,39657			
30	Хидрогелови	3	0,35370	0,11179	168,4286	<0,0001*
	Грешка	8	0,00560	0,00070		
	Укупно	11	0,35930			
65	Хидрогелови	3	0,37582	0,12527	78,2969	<0,0001*
	Грешка	8	0,01280	0,00160		
	Укупно	11	0,38862			
98	Хидрогелови	3	0,44447	0,14816	148,1556	<0,0001*
	Грешка	8	0,00800	0,00100		
	Укупно	11	0,45247			
120	Хидрогелови	3	0,39680	0,13227	97,9753	0,0001*
	Грешка	8	0,01080	0,00135		
	Укупно	11	0,40760			
150	Хидрогелови	3	0,46420	0,15473	116,0500	<0,0001*
	Грешка	8	0,01067	0,00133		
	Укупно	11	0,47487			
365	Хидрогелови	3	0,80062	0,26687	246,3462	<0,0001*
	Грешка	8	0,00867	0,00108		
	Укупно	11	0,80929			

Connecting Letters Report

Време (дан)	Ниво	Група	Средња вредност	Стандардна грешка
8	X-KP CT	A	7,6233	0,01528
	X-KM CT	B	7,5200	0,01528
	X-KP 80	B	7,5167	0,01528
	X-KM 80	C	7,4467	0,01528
16	X-KP 80	A	7,7667	0,01856
	X-KM CT	B	7,6467	0,01856
	X-KM 80	C	7,4367	0,01856
	X-KP CT	D	7,3033	0,01856
30	X-KP 80	A	7,9500	0,01528
	X-KM CT	B	7,5833	0,01528
	X-KM 80	B	7,5633	0,01528
	X-KP CT	B	7,5233	0,01528
65	X-KP 80	A	7,7600	0,02309
	X-KM CT	B	7,5733	0,02309
	X-KP CT	C	7,3433	0,02309
	X-KM 80	C	7,3333	0,02309
98	X-KP 80	A	8,0067	0,01826
	X-KM CT	B	7,7633	0,01826
	X-KP CT	C	7,5600	0,01826
	X-KM 80	C	7,5233	0,01826
120	X-KP 80	A	7,8200	0,02121
	X-KM CT	B	7,6867	0,02121
	X-KP CT	C	7,4467	0,02121
	X-KM 80	C	7,3667	0,02121
150	X-KP 80	A	7,8833	0,02108
	X-KM CT	B	7,6867	0,02108
	X-KP CT	C	7,5533	0,02108
	X-KM 80	D	7,3433	0,02108
365	X-KP 80	A	5,2833	0,01900
	X-KM CT	B	5,1233	0,01900
	X-KP CT	C	5,0733	0,01900
	X-KM 80	D	5,0233	0,01900

Звездика (*) указује на статистички значајне вредности ($p < 0,05$)
Нивои који нису повезани истим словом се значајно разликују
Скраћенице су дате у табели 31

Поређења међу групама показала су следећи образац:

- 2. дан: X-KP ТК има највишу проводљивост (7,690; група А). X-KP СТ и X-KM СТ чине средњи слој (7,523 и 7,437), док је X-KM ТК најнижи (7,407);



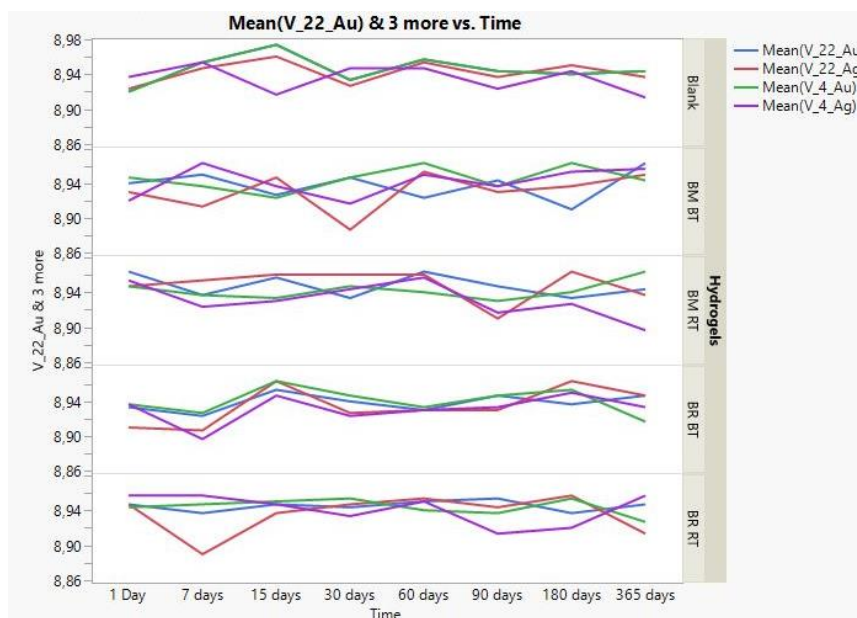
- 8. дан: X-KP CT се одваја као највиши (7,623; A), док су X-KM CT и X-KP TK слични (7,520 и 7,517; група B). X-KM TK је најнижи (7,447; C);
- 16. дан: X-KP TK доминира (7,767; A), X-KM CT је стабилно у средини (7,647; B), X-KM TK (7,437; C) и посебно X-KP CT (7,303; D) су најнижи;
- 30. дан: X-KP TK се јасно одваја (7,950; A), док су X-KM CT, X-KM TK и X-KP TK груписани у средњи слој (7,583 – 7,523; B);
- 65. дан: X-KP TK поново води (7,760; A), X-KM CT заузима средину (7,573; B), док су X-KM TK и X-KP CT најнижи и међусобно слични (7,333 и 7,343; C);
- 98. дан: X-KP TK остаје на врху (8,007; A), X-KM CT прати (7,763; B), а X-KM TK и X-KP CT остају значајно нижи и међусобно нераздвојиви (7,523 и 7,560; C);
- 120. дан: X-KP TK одржава лидерску позицију (7,820; A), X-KM CT је поново средњи (7,687; B), док су X-KM TK и X-KP CT блиски и нижи (7,367 и 7,447; C);
- 150. дан: Највећа разлика – X-KP TK је највиши (7,883; A), X-KM CT средњи (7,687; B), X-KP CT нижи (7,553; C), док X-KM TK остаје најслабији (7,343; D);
- 365. дан: X-KP TK и даље води (8,347; A), X-KM CT је врло близу (8,170; B), X-KP CT заузима средину (7,850; C), док X-KM TK значајно заостаје (7,690; D).

Вредности проводљивости су на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ углавном више од оних на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, нарочито за X-KM TK и X-KM CT. Код X-KP TK и X-KP CT разлика је мање конзистентна, тј. на почетку (2 – 8 дана) вредности су чак нешто ниже на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, али после 30. дана стабилно прелазе изнад оних на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Вредности за Blank су исте на овим температурама.

4.4.3 Стабилност хидрогелова са наночестицама сребра и злата

4.4.3.1 Промена вискозности хидрогелова

Праћењем вискозности хидрогелова током периода од 365 дана на две различите температуре складиштења ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) и са различитим честицама метала (Au и Ag) може се проценити стабилност формулација добијених употребом екстраката припремљених различитим поступцима екстракције (мацерација и екстракција уз рефлукс) и условима синтезе наночестица (собна температура и температура кључања). Резултати приказани на слици 56 доводе до неколико кључних закључака.



Слика 56. Промена вискозности хидрогелова са наночестицама сребра и злата током времена

Утицај температуре складиштења. Генерално, криве које представљају хидрогелске формулације чуване на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (V_4_Au и V_4_Ag) показују мању варијабилност и уједначенији ток у поређењу са формулацијама чуваним на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (V_22_Au и V_22_Ag). Ово потврђује да је нижа температура погоднија за очување стабилности колоидних система, што је у складу са очекивањем да смањена термичка енергија успорава агрегацију и деградацију компоненти хидрогела.

Утицај врсте металних наночестица. Разлике између Ag и Au система су незнатне. Ипак, чини се да формулације са златом имају благо смањене осцилације у поређењу са еквивалентним формулацијама са сребром, нарочито при складиштењу на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. То сугерише да Au наночестице доприносе бољој структурној стабилизацији мреже хидрогела, вероватно услед њихове већ познате хемијске инертности и слабије склоности ка оксидацији у односу на Ag (Alam et al., 2025; Oliveira et al., 2015).

Утицај начина припреме екстракта (мацерација/рефлукс). Хидрогелови са екстрактима добијеним мацерацијом (KM) показују израженије флукуације кроз време, посебно у варијанти X-KM ТК (мацерација, синтеза на температури кључања). Ово указује да мацерација вероватно обезбеђује мање стабилну фракцију биоактивних компоненти купине које не доприносе дугорочној стабилности система. Насупрот томе, хидрогелови са екстрактима добијеним уз рефлукс (KP) показују стабилније профиле



вискозитета, што сугерише да интензивнији услови екстракције обезбеђују екстракте богатије стабилним фенолним једињењима или полимерима који остварују бољу стабилизацију мреже у присуству наночестица.

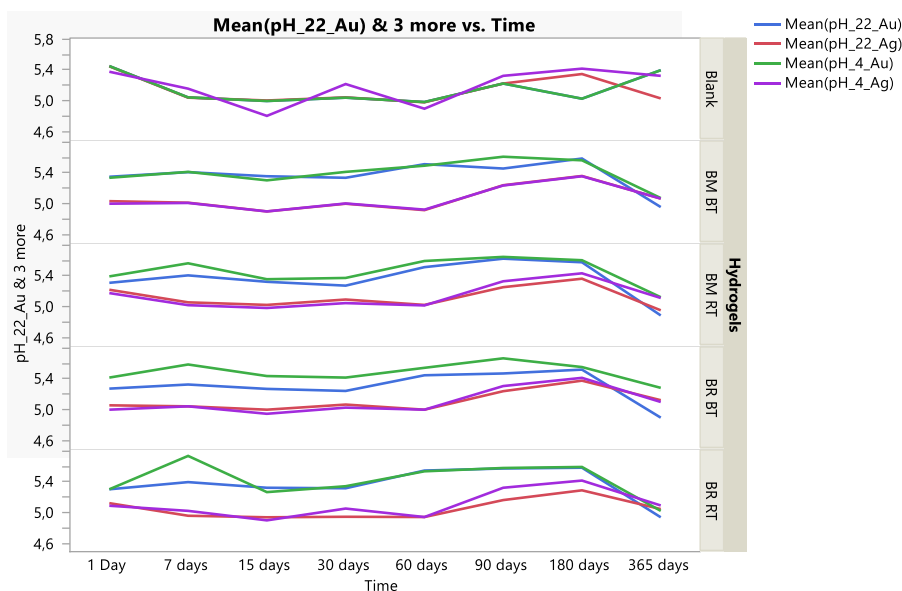
Утицај услова синтезе (СТ/ТК). Хидрогелови са наночестицама синтетисаним на собној температури (СТ) показују већу стабилност у односу на оне са наночестицама синтетисаним на температури кључања (ТК). Посебно се истиче Х-КР СТ формулација, код које су осцилације минималне кроз читав период од 365 дана. Ово сугерише да блажи услови синтезе наночестица омогућавају очување интегритета екстрактивних молекула и спречавају деструкцију компонената које доприносе формирању стабилне хидрогелне мреже.

Идентификација најстабилније формулације. Комбиновањем наведених фактора јасно се издваја Х-КР СТ формулација чувана на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, без обзира на врсту металних наночестица. Њене криве током времена остају најближе почетној вредности вискозитета, уз најмање флукуације. Ово је кључни налаз јер указује на оптималне услове за синтезу и складиштење: екстракција уз рефлукс + собна температура синтезе + чување на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Дакле, резултати указују да стабилност хидрогела зависи од комбинованог дејства температуре складиштења, типа металних честица и начина припреме екстракта. Док наночестице сребра и злата показују релативно сличан утицај, предност имају формулације са златом. Кључни фактори за дугорочну стабилност идентификовани су у употреби екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс, синтези наночестица на собној температури и чувању хидрогела на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Овај резултат има практичну вредност јер омогућава дефинисање оптималног технолошког поступка за припрему стабилних биоактивних хидрогела погодних за даљу примену.

4.4.3.2 Промена рН вредности хидрогелова

Праћење рН вредности представља кључни параметар за процену хемијске и микробиолошке стабилности хидрогела. Промене рН током времена могу указивати на разградњу полимерних ланаца, оксидацију металних наночестица или микробиолошку активност у систему (Visan et al., 2021). Резултати добијени током 365 дана јасно указују на неколико образаца (сл. 57).



Слика 57. Промена рН вредности хидрогелова са наночестицама сребра и злата током времена

Опти ти тренд кроз време. У свим формулацијама забележен је благи пад рН током периода складиштења од годину дана, нарочито изражен у завршним временским тачкама (180 и 365 дана). Ово сугерише спору киселинску деградацију или ослобађање слабих киселих компоненти из матрикса. Такав тренд је очекиван код биоактивних хидрогела, јер полифеноли и други биомолекули из екстракта могу хидролизовати током дужег складиштења (Liu et al., 2025; Liu et al., 2024).

Утицај температуре складиштења (4 °C/22 °C). Формулације чуване на $T = 4\text{ °C}$ (рН_4_Au и рН_4_Ag) показују стабилнији рН, са мањим одступањима током времена, док су узорци чувани на $T = 22\text{ °C}$ (рН_22_Au и рН_22_Au) склонији израженијем паду рН вредности. Ово потврђује да је хладно складиштење неопходно за очување хемијске стабилности и успоравање разградних процеса.

Утицај врсте наночестица (Au/Ag). Разлике између система са Au и Ag наночестицама су мале, али формулације са златом показују нешто конзистентније вредности рН током времена, нарочито у групама чуваним на $T = 4\text{ °C}$. Сребро је познато по већој хемијској реактивности (оксидација и формирање Ag^+ јона), што може допринети киселијем микроокружењу током времена (Pasparakis, 2022). Ово се огледа у нешто израженијем паду рН код Ag система.



Утицај екстракције (КМ/КР). Хидрогелови са екстрактима добијеним екстракцијом уз рефлукс (Х-КР) генерално показују стабилнији рН профил него они са мацератима (Х-КМ). У КМ варијантама (посебно Х-КМ СТ) бележи се израженији пад рН кроз време, што указује да мацерација вероватно не екстрахује довољно стабилне фенолне и полимерна једињења која могу амортизовати промене рН. Рефлукс, као интензивнија метода екстракције, обезбеђује екстракт са већим садржајем антиоксидативних компоненти које стабилизују систем.

Утицај услова синтезе (СТ/ТК). Хидрогелови са наночестицама синтетисаним на собној температури показују конзистентнији рН током времена, док синтеза наночестица на температури кључања резултује нешто већим осцилацијама и бржим падом рН код хидрогелова са њима. Ово је вероватно последица деградације биоактивних молекула током синтезе наночестица на вишим температурама чиме се смањује капацитет хидрогела да одржава рН стабилним.

Најстабилнија формулација. Комбиновањем ових фактора, најстабилније рН вредности уочене су код Х-КР СТ формулација чуваних на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, при чему разлике између Аи и Аg варијанте нису велике, али је предност и даље благо на страни злата. Ове формулације показују најмање одступање и најспорији пад рН кроз читав период од 365 дана.

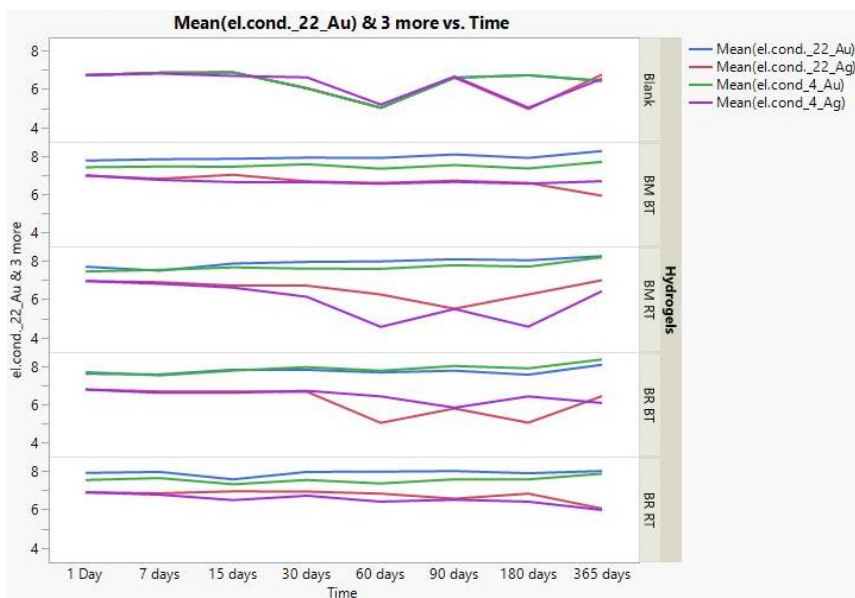
Промене рН вредности током времена потврђују да је стабилност хидрогела вишефакторски одређена. Кључни фактори стабилности идентификовани су: складиштење на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, употреба екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс и синтеза наночестица при собној температури. Наночестице злата имају благу предност у очувању стабилности у односу на сребро. Оптимална формулација за дугорочну стабилност рН је стога Х-КР СТ и складиштење на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и наночестице злата. Ови резултати пружају значајан увид у то како избор екстракције, синтезе и температуре може усмеравати хемијску постојаност хидрогелских система намењених примени у биомедицини или фармацији.

4.4.3.3 Промена електричне проводљивости хидрогелова

Праћење електричне проводљивости током времена представља важан индикатор структурних и хемијских промена у хидрогелној мрежи, као и потенцијалног



ослобађања јона из екстракта или металних наночестица (Koungkolos et al., 2023). Промене проводљивости могу одражавати дезинтеграцију матрикса, оксидацију метала или миграцију растворљивих једињења (Сао et al., 2024). Резултати добијени током 365 дана указују на специфичне обрасце зависне од температуре складиштења, врсте наночестица и начина припреме (сл. 58).



Слика 58. Промена електричне проводљивости хидрогелова са наночестицама сребра и злата током времена

У свим формулацијама проводљивост показује благе осцилације током времена. У поређењу са вискозитетом и рН, где су промене биле углавном линеарне (пад или мања варијација), проводљивост показује нешто израженије флукуације, нарочито у формулацијама са сребром. Ово указује да је електрична проводљивост осетљивији параметар и да може боље рефлектовати fine промене у колоидној структури хидрогела.

Утицај температуре складиштења. Формулације чуване на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (el.cond_4_Au, el.cond_4_Ag) имају стабилније вредности проводљивости у односу на оне чуване на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Посебно се види да на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ проводљивост хидрогелова са наночестицама сребра показује израженије одступање, нарочито у Х-КР СТ и Х-КМ СТ варијантама. Ово потврђује да нижа температура складиштења значајно доприноси смањењу јонске миграције и хемијске нестабилности.



Утицај врсте металних честица (Au/Ag). Системи са наночестицама злата показују конзистентније профиле проводљивости кроз време. Насупрот томе, формулације са наночестицама сребра имају израженије осцилације, што се може повезати са познатом реактивношћу сребра (ослобађање Ag^+ јона и оксидација), што доводи до варијација у јонском саставу и, самим тим, у електричној проводљивости (Cao et al., 2024).

Утицај екстракције (KM/KP). Формулације са екстрактом добијеним екстракцијом уз рефлукс (X-KP) показују стабилнији тренд проводљивости у односу на формулације са мацератима (X-KM). У X-KM ТК и X-KM СТ групама видљив је нешто израженији пад или осцилације проводљивости, што сугерише да биоактивни молекули добијени мацерацијом немају једнак капацитет да стабилизују јонско окружење у хидрогелу.

Утицај услова синтезе (СТ/ТК) наночестица. Синтеза наночестица на собној температури генерално даје стабилније профиле проводљивости хидрогелова са овим честицама у односу на профиле хидрогелова са наночестицама синтетисаних на температури кључања. Термички стрес током кључања може довести до разградње компонената које утичу на баланс јона и електропроводљивост, што се одражава кроз веће флукуације проводљивости код ТК формулација.

Најстабилнија формулација. Најмање одступање уочено је код X-KP СТ формулација са златом, чуваних на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, што је у складу са налазима за вискозитет и рН. Ове формулације одржавају релативно константне вредности проводљивости током 365 дана, док је у варијантама са наночестицама сребра забележена већа варијабилност.

Резултати указују да је електрична проводљивост осетљив параметар за процену стабилности хидрогела јер јасно разликује утицај врсте наночестица метала и температуре складиштења. Као и код вискозитета и рН, најстабилнија комбинација је екстракција уз рефлукс + синтеза наночестица на собној температури + складиштење хидрогелова на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, при чему су наночестице злата показале предност у односу на наночестице сребра. Овај конзистентан образац кроз сва три испитивана параметра потврђује да је правилним избором екстракције, синтезе и услова чувања могуће постићи високу дугорочну стабилност биоактивних хидрогела.



Општа анализа (вискозитет, рН, електрична проводљивост). У овој студији су праћени кључни параметри стабилности хидрогелова (вискозитет, рН и електрична проводљивост) током 365 дана, при различитим условима припреме и складиштења. Сви посматрани параметри показали су релативно уске интервале вредности, што указује на високу базну стабилност система, без драстичних деградација или губитка функционалности током времена. Управо та конзистентност мерења кроз три независна параметра (механички, хемијски и електрохемијски) представља снажну потврду робусности формулација.

Вискозност. Промене вискозности биле су минималне, са варијацијама унутар треће децимале (око $8,9 \pm 0,02$). Овај уски распон сугерише да мрежа хидрогела није значајно нарушена током чувања, те да су присутне интеракције између полимерних ланаца и наночестица метала стабилне.

рН вредности. рН вредности су показале благи пад, нарочито у каснијим временским тачкама (180 – 365 дана), али и даље унутар опсега $\sim 4,8 - 5,4$. То значи да нема драматичног закишељавања или дестабилизације. Уочен пад се може приписати постепеном ослобађању киселих компонената из биоекстракта, али је и он остао у врло уским границама.

Електрична проводљивост. Проводљивост је показала нешто више осцилација од вискозитета и рН, нарочито код формулација са сребром. Ипак, и овде су вредности остале у стабилном опсегу, без прогресивног раста или пада. То значи да јонски баланс у хидрогелној мрежи није значајно нарушен, што је нарочито важно за биомедицинску примену.

Улога технологије припреме и складиштења. Иако су апсолутне промене мале, јасно се понавља образац:

Екстракти добијени екстракцијом уз рефлукс дају стабилније формулације од екстраката добијених мацерацијом.

Наночестице синтетисане на собној температури дају стабилније формулације од оних синтетисаних на температури кључања.

Складиштење на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ значајно ублажава флукуације свих мерених параметара.



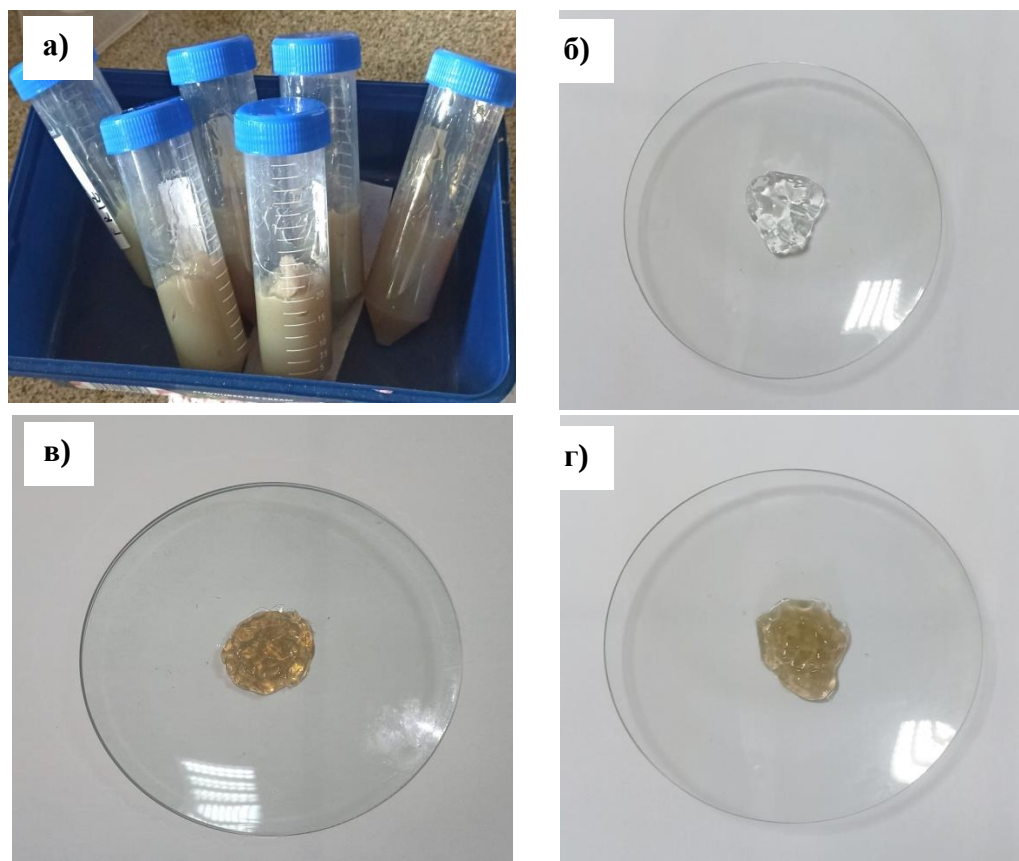
Наночестице са златом показују предност над наночестицама са сребром, посебно кад је стабилност рН вредности и проводљивости хидрогелова у питању.

Као крајни закључак може се сумирати да је праћењем вискозитета, рН и електричне проводљивости потврђено да развијени хидрогелови представљају стабилне системе током чувања у периоду од 12 месеци. Промене свих испитиваних параметара кретале су се у уским границама, што указује на очување структурног и хемијског интегритета формулација. Као најповољнија комбинација идентификована је формулација добијена употребом наночестица злата синтетисаних на собној температури, помоћу водених екстраката листа купине добијених екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, при складиштењу хидрогела на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ова комбинација обезбеђује највиши степен дугорочне стабилности и може се сматрати оптималном за даљу проверу у циљу евентуалне биомедицинске примене.

4.4.4 Органолептичке карактеристике хидрогелова

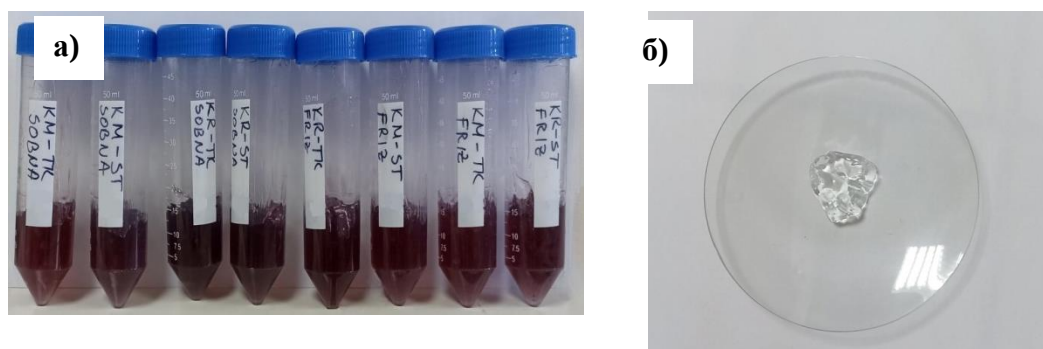
Органолептичке карактеристике хидрогелова, у контексту овог рада, обухватају визуелна (боја и изглед) и олфакторна (мирис) својства. Физичка стабилност након центрифугирања и хомогеност хидрогел формулација такође су испитиване током 12 месеци складиштења. Фотографска поређења хидрогелова, како следеће пробае тако и оних синтетисаних са AgNPs-E, одмах након припреме и након 12 месеци складиштења приказана су на слици 59, док је поређење хидрогелова са AuNPs-E приказано на слици 60. За визуелну процену, по 2 g сваке хидрогелне формулације (са AgNPs-E и AuNPs-E) нането је на сахатно стакло. Контролни (Blank) хидрогел је безбојан и без мириса, што је у складу са очекивањима за матрицу без активних компоненти.

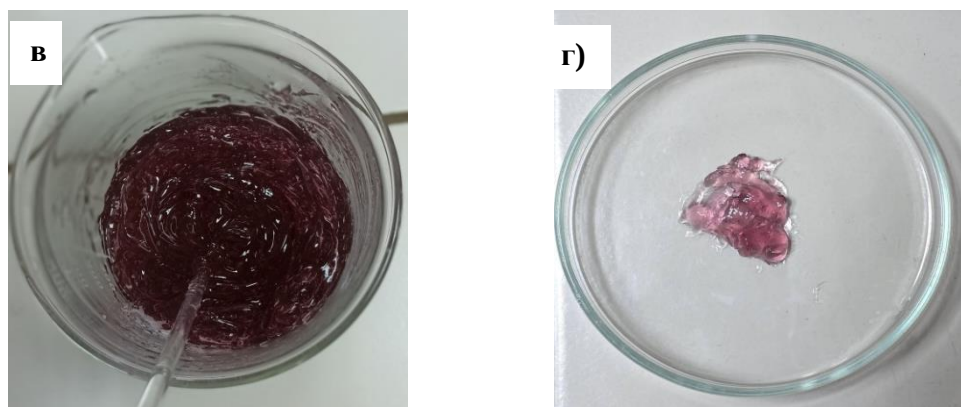
Формулације са AgNPs-E задржале су неутралан мирис, али су показале зелену или светло-смеђу боју (сл. 59), у зависности од врсте AgNPs-E уграђених током њихове припреме.



Слика 59. Изглед хидрогелова са AgNPs-E складиштених на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (а); blank хидрогел без AgNPs-E (б); хидрогел складиштен на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ формиран од наночестица синтетисаних на собној температури применом екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс (Х-КР СТ) (в); хидрогел складиштен на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ формиран од наночестица синтетисаних на температури кључања применом екстракта добијеног мацерацијом (Х-КМ ТК) (г)

Хидрогелови са AuNPs-E имају љубичасту боју, која потиче од синтетисаних наночестица злата (сл. 60).





Слика 60. Изглед хидрогелова са AuNPs-E складиштених на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (а); blank хидрогел без AuNPs-E (б); хидрогел складиштен на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ формиран са наночестицама синтетисаним на собној температури применом екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс (Х-КР СТ) (в); хидрогел складиштен на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ формиран са наночестицама синтетисаним на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ применом екстракта добијеног мацерацијом (Х-КМ 80) (г)

Интензитет и нијанса боје могу послужити као индиректни показатељ успешности синтезе и инкорпорације наночестица у хидрогелну матрицу. Ови резултати такође сугеришу да се визуелне карактеристике могу користити као једноставан квалитативни индикатор присуства и типа металних наночестица у хидрогелу. Резултати добијени током једногодишњег периода складиштења показали су очувана визуелна својства (боја и изглед), олфакторна својства (мирис), као и физичка стабилност и хомогеност формулација (таб. 39 и 40 за AgNPs-E и AuNPs-E, респективно).

Blank формулације показале су задовољавајућу физичку стабилност будући да под утицајем механичког напрезања није дошло до фазне сепарације. Тест центрифугирања је потврдио добру физичку стабилност формулација AgNPs-E и AuNPs-E након периода од 12 месеци складиштења, без знакова фазне сепарације. На основу резултата органолептичког испитивања (таб. 39 и 40), може се уочити да су хидрогелни препарати били хомогени и без мириса.

Основна разлика између хидрогелова формираних са наночестицама сребра и злата и blank формулација је у боји, док остала физичко-хемијска својства остају углавном конзистентна, што сугерише да формулације одржавају своју стабилност. Такође је примећено да укључивање биљног екстракта и синтетисаних AgNP-E и AuNP-E не утиче негативно на интегритет хидрогела. Штавише, нису примећене значајне промене ни током 12 месеци складиштења. Дакле, присуство синтетисаних наночестица метала стабилизираних биљним екстрактима доводи до карактеристичне обојености



хидрогелова, док интензитет боје, као и нијанса, директно зависе од више фактора, укључујући величину и облик наночестица, њихову концентрацију, врсту употребљеног биљног екстракта, као и специфичне услове синтезе под којима се синтеза одвија (температура, pH, време реакције, и др.) (Ontong et al., 2020). Стабилизација AgNPs екстрактом листа *Rhodomyrtus tomentosa* (Ontong et al., 2020) или компонентама *Fusarium oxysporum* (Scandorieiro et al., 2023), коришћеним у формирању хидрогелова, резултирала је светло смеђим геловима. Слично томе, хидрогелови формулисани са AgNP стабилизованим екстрактом ризома *Curcuma longa* (Ermavati et al., 2022) били су без мириса и показали су бледо наранџасту боју, која се пропорционално појачавала са повећањем концентрација активног једињења. Такође, Rahmavati и сар. (2019) су објавили резултате о формирању смеђих гелова када се користи екстракт јагоде за синтезу AgNP.

У доступној литератури нема студија које описују хидрогелове са наночестицама злата, припремљене коришћењем сличне методологије, што ограничава могућност директног поређења добијених резултата. Ова чињеница истиче потребу за даљим истраживањима у циљу бољег разумевања понашања таквих система како би се стандардизовале методе за њихову карактеризацију и процену функционалности, нарочито у биомедицинском и фармацеутском пољу примене.

Табела 39. Органолептичке карактеристике и физичка стабилност blank хидрогела и хидрогелних формулација са AgNPs-E, складиштених у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током 12 месеци

Формулација	Боја	Мирис	Хомогеност	Физичка стабилност*
Blank хидрогел	Безбојан	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ СТ $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-зелена	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ СТ $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-зелена	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР СТ $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-смеђа	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР СТ $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-смеђа	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ ТК $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-зелена	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ ТК $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-зелена	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР ТК $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-смеђа	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР ТК $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло-смеђа	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације

*Физичка стабилност хидрогелова одређена тестом центрифугирања
Скраћенице су дате у табели 20



Табела 40. Органолептичке карактеристике и физичка стабилност blank хидрогела и хидрогелних формулација са AuNPs-E, складиштених у мраку, на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, током 12 месеци

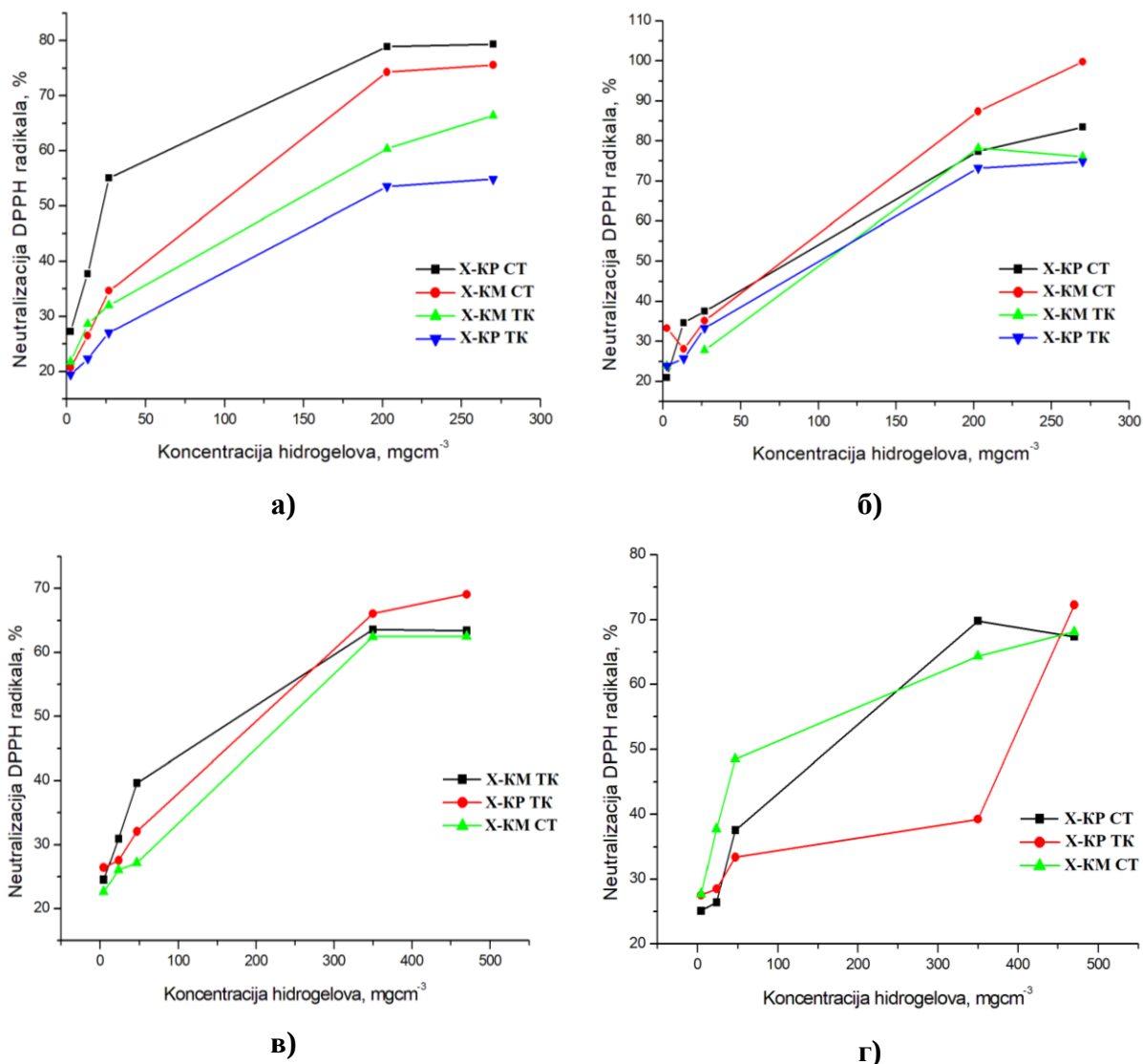
Формулација	Боја	Мирис	Хомогеност	Физичка стабилност*
Blank хидрогел	Безбојан	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ СТ $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ СТ $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР СТ $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Тамно Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР СТ $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Тамно Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ 80 $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КМ 80 $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Светло Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР 80 $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	Тамно Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације
X-КР 80 $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Тамно Љубичаста	Без мириса	Хомоген	Без фазне сепарације

*Физичка стабилност хидрогелова одређена тестом центрифугирања
Скраћенице су дате у табели 31

4.5 Биолошка активност хидрогелова

4.5.1 Антиоксидативна активност хидрогелова са наночестицама сребра

На слици 61 дат је упоредни приказ неутрализације DPPH радикала од стране хидрогелова са синтетисаним наночестицама, складиштеним на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Неутрализација DPPH радикала се може посматрати визуелно, променом боје система од љубичасте до жуте, што се спектрофотометријски прати мерењем апсорбанце на 517 nm.



Слика 61. Неутрализација DPPH радикала (%) у функцији концентрације хидрогелова (mgcm^{-3}) формираним са наночестицама сребра, складиштеним 24 h од припреме на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (а) и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (б); након 365 дана складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (в) и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (г). Скраћенице имају значење дато у табели 20

EC_{50} вредности хидрогелова тестираних 24 h и 365 дана након припреме и складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у мраку, дате су у табели 41.

Табела 41. EC_{50} вредности хидрогелова тестираних 24 h и 365 дана након припреме и складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, у мраку

Узорак	$\text{EC}_{50} [\text{mgcm}^{-3}]$			
	$t = 24\text{ h}$		$t = 365\text{ дана}$	
	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$
X-KM CT	$76,82 \pm 0,02$	$95,22 \pm 0,03$	$75,73 \pm 0,02$	$243,2 \pm 0,2$
X-KM TK	$104,45 \pm 0,03$	$138,76 \pm 0,01$		$178,4 \pm 0,1$
X-KP CT	$81,81 \pm 0,02$	$23,07 \pm 0,02$	$163,8 \pm 0,01$	
X-KP TK	$100,44 \pm 0,01$	$179,65 \pm 0,03$	$389,2 \pm 0,15$	$207,01 \pm 0,02$



Скраћенице су дате у табели 20

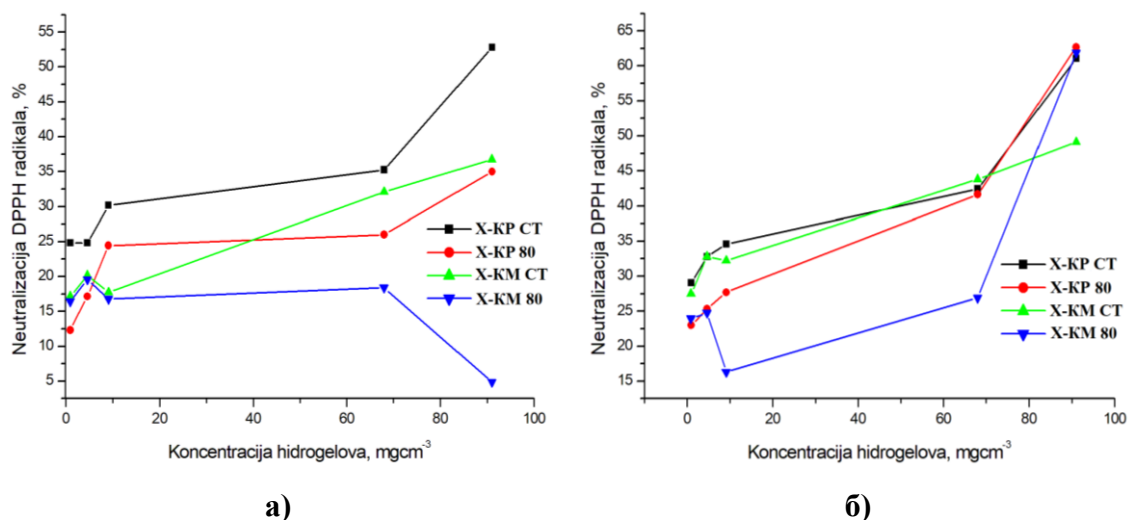
Хидрогел Х-КР СТ, складиштен на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, показао је највећу антиоксидативну активност са најнижим EC_{50} вредностима од $23,07 \pm 0,02\text{ mgcm}^{-3}$ (таб. 41). Ови резултати су у складу са раније дискутованим резултатима у поглављу 4.3.1.1, која се тичу антиоксидативних својстава екстраката и синтетисаних наночестица (Stevanović et al., 2019). Екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс показао је већу способност неутрализације слободних радикала у поређењу са екстрактом добијеним мацерацијом, што се може се објаснити чињеницом да рефлукс ефикасније екстрахује биомолекуле из листова купине који учествују у редукцији металних јона (Tasić et al., 2024). AgNPs-E синтетисане на температури кључања, и оне синтетисане на собној температури, имале су сличне EC_{50} вредности (Stevanović et al., 2019). С друге стране, хидрогел који садржи наночестице синтетисане екстрактом добијеним мацерацијом (Х-КМ СТ) показао је највећу антиоксидативну активност међу хидрогеловима чуваним на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{EC}_{50} = 76,82 \pm 0,02\text{ mgcm}^{-3}$). Иначе, наночестице синтетисане на собној температури су показале бољу способност неутрализације DPPH радикала у поређењу са наночестицама синтетисаним на температури кључања (поглавље 4.3.1.1; Stevanović et al., 2019); тај тренд се задржао и код хидрогела који садржи поменуте честице. На основу наведеног, може се закључити да синтетисане AgNPs-E задржавају своју природу унутар хидрогела у смислу антиоксидативне активности, тј. да формирање хидрогела нема ефекта, или, боље речено, има униформни ефекат на функционалне групе којима наночестице неутралишу DPPH радикал. У поређењу са биокомпатибилним хидрогелом за зарастање рана на бази карбопола, који су тестирали Sharma и сарадници (2025), Х-КР СТ хидрогел чуван на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ је показао већу способност неутрализације DPPH радикала, скрећући пажњу на значајан потенцијал хидрогелова синтетисаних у овом раду (што је у складу са издвајањем овог типа хидрогела у претходном поглављу по питању стабилности). Такође, занимљиво је да је само Х-КР СТ показао већу активност након 24 сата складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ у поређењу са другим хидрогеловима који су генерално показали већу активност након складиштења на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (таб. 41). Изостанак резултата за антиоксидативну активност хидрогелова Х-КМ ТК ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) и Х-КР СТ ($T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$), након годину дана складиштења, представља последицу техничких ограничења и пропуста у току експерименталног процеса. Генерално, тестирани узорци су показали значајно нижу активност након једногодишњег периода складиштења на датим температурама.



Изузетак је Х-КМ СТ ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) чија је активност остала практично непромењена. Разлог значајно ниже антиоксидативне активности након једногодишњег складиштења може бити постепена деградација биомолекула из екстракта, као и промене које се јављају у структури хидрогелова током времена. Постоји могућност појаве оксидације фенолних једињења, флавоноида и других активних компоненти који имају антиоксидативну способност (Iftime et al., 2024). Што се наночестица тиче, могућа је појава дифузије у полимерној матрици, као и потенцијална агрегација наночестица сребра. Ова појава може утицати на доступност њихових активних површина за реакцију са радикалима (Harun-Ur-Rashid et al., 2025). На смањење способности неутралисања слободних радикала може утицати и делимична дехидратација хидрогела, услед складиштења током једногодишњег периода. Ова могућност у том случају изазива промену распореда и самим тим мобилност активних компоненти из хидрогелова (Karooy and Wilson, 2021). Међутим, поређењем резултата из табеле, на основу узорка Х-КМ СТ складиштеног на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, можемо закључити да нижа температура успорава деградацију и вероватно у одређеном проценту чува структуру хидрогела (што је потврђено у претходном поглављу). Овај закључак још једном упућује да су контролисани услови складиштења од великог значаја за будуће козметичке формулације припремане употребом овако дизајнираних хидрогелова.

4.5.2 Антиоксидативна активност хидрогелова са наночестицама злата

На слици 62 дат је упоредни приказ неутрализације DPPH радикала хидрогеловима формираним са AuNPs-E, складиштеним на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, у мраку, док су EC_{50} вредности, хидрогелова тестираних 24 h након припреме и складиштења под наведеним условима, дате у табели 42.



Слика 62. Неутрализација DPPH радикала (%) у функцији концентрације хидрогелова (mgcm^{-3}) формираним са наночестицама злата и складиштеним 24 h на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ **а)** и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ **б)**, у мраку. Скраћенице имају горе наведено значење

Табела 42. EC_{50} вредности као мера неутрализације DPPH радикала у функцији концентрације хидрогелова тестираних 24 h након припреме и складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, у мраку

Узорак	$\text{EC}_{50} [\text{mgcm}^{-3}]$	
	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$
X-KM CT	/	/
X-KM 80	$83,18 \pm 0,01$	/
X-KP CT	$77,35 \pm 0,01$	$87,34 \pm 0,02$
X-KP 80	$77,17 \pm 0,02$	/

Скраћенице су дате у табели 31

Вредности EC_{50} , одређене на основу DPPH теста за хидрогелове који су показали способност неутрализације више од 50% DPPH радикала (таб. 42), указују на разлике у антиоксидативној активности у зависности од услова синтезе и складиштења. Најнижу EC_{50} вредност, тј. највећу ефикасност у неутрализацији слободних радикала показао је узорак X-KP 80 ($77,17 \pm 0,02\text{ mgcm}^{-3}$), који је чуван на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Овај хидрогел је формулисан употребом AuNPs-E синтетисаних на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и стабилованих биљним екстрактом добијеним екстракцијом уз рефлукс; ово сугерише да повишена температура синтезе наночестица, у комбинацији са активним једињењима из екстракта, доприноси бољој антиоксидативној активности.

Међу узорцима који су чувани на собној температури, само је X-KP CT показао способност да неутралише више од 50% DPPH радикала ($\text{EC}_{50} = 87,34 \pm 0,02\text{ mgcm}^{-3}$). X-KP CT је хидрогел формиран од AuNPs-E синтетисаних и стабилованих при блажим



условима, што сугерише да наночестице злата могу задржати значајан антиоксидативни потенцијал без употребе виших температура, посебно у присуству биомолекула изолованих екстракцијом уз рефлукс. Ови резултати су у складу са резултатима који су показале саме наночестице, према којима су КР СТ показале доминантну активност ($EC_{50} = 0,0108 \text{ mgcm}^{-3}$) (таб. 15), што додатно потврђује важност избора биолошких агенаса у стабилизацији и функцији синтетисаних наночестица.

Чињеница да сами екстракти, коришћени у формулацијама хидрогелова, показују изразит антиоксидативни потенцијал (поглавље 4.3.1.1, Stevanović et al., 2019), указује да антиоксидативна активност хидрогелова потиче од биомолекула из екстраката који у исто време врше и стабилизацију синтетисаних наночестица. Иницијални резултати су указали на ограничену или непостојећу способност неутрализације слободних радикала у значајнијем проценту (изнад 50%) код већине узорака хидрогелова. Имајући то у виду, даља испитивања ове активности након годину дана складиштења нису спроведена, јер се није очекивало значајно побољшање или задржавање активности током времена.

4.5.3 Анти-инфламаторна активност хидрогелова *in vitro*

Анти-инфламаторна активност хидрогелова чини их обећавајућом платформом за различите терапеутске примене. Могу се дизајнирати и модификовати да ослобађају анти-инфламаторне молекуле, олакшавајући лечење упала. Хидрогелови су подвргнути испитивању анти-инфламаторне активности непосредно након припреме. Испитивање је спроведено на хидрогеловима који су показали добру способност неутрализације слободних радикала (антиоксидативну активност), што је коришћено као критеријум за њихов даљи одабир. Код хидрогелова са наночестицама злата, најбољу антиоксидативну активност показао је узорак складиштен на $T = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, док је од узорака чуваних на $T = 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ само један показао способност неутрализације слободних радикала.

4.5.3.1 Анти-инфламаторна активност хидрогелова са наночестицама сребра

У физиолошким условима имуне ћелије континуирано генеришу реактивне врсте кисеоника (ROS) као део одбране домаћина од микробних патогена. Међутим, код хроничних рана, прекомерна производња ROS доводи до ћелијског оштећења и значајно нарушава процес зарастања рана. Стога, супресија ROS представља критични терапеутски циљ. Изражена антиоксидативна активност испитиваних хидрогелова



против DPPH радикала (сл. **61(a и б))** се може довести у везу са њиховим анти-инфламаторним потенцијалом, узимајући у обзир механизме упале и централну улогу ROS у њима. Будући да је денатурација протеина добро препознатљив маркер упале, денатурација говеђег серумског албумина (BSA) се широко користи као стандардни модел за процену анти-инфламаторне активности (Ruffo et al., 2022).

Ограниченост расположивих ресурса условила је да се анти-инфламаторна активност испитује искључиво код узорак са најизраженијим антиоксидативним ефектом, при чему су добијени резултати приказани у табели **43**. Анти-инфламаторни потенцијал хидрогелова указује на њихову перспективност у терапијским применама, будући да је могуће њихово прилагођавање и модификација ради контролисаног ослобађања активних молекула и ефикаснијег ублажавања упалних процеса.

Табела 43. Анти-инфламаторна активност хидрогелова са наночестицама сребра на албумин говеђег серума (BSA)

Узорак	Температура складиштења	Инхибиција (%)
Blank	22 °C	78,87±0,00832
X-KP CT	22 °C	84,49±0,00748
X-KM CT	4 °C	82,12±0,00986
Диклофенак-натријум		95,60±0,00100

Скраћенице су дате у табели **20**

Тестирани хидрогелови су показали задовољавајући инхибиторни ефекат на денатурацију BSA у поређењу са референтним стандардом диклофенак-натријумом (таб. **43**). При концентрацији од $0,1 \text{ mgcm}^{-3}$, хидрогелови су показали значајну антиинфламаторну активност. Под упоредивим експерименталним условима, примећена активност је већа у поређењу са резултатима које су објавили Ruffo и сарадници (2022). Штавише, заштитни ефекат измерен у овој студији био је већи од оног код хидрогелова формулисаних са Carborol 974P, импрегнираних са AgNP синтетисаним коришћењем водених екстраката ризома *Cyperus rotundus*, како су описали Sharma и сарадници (2025). Ови резултати сугеришу да је развијена формулација хидрогелова показала побољшани анти-инфламаторни потенцијал у односу на претходно тестиране системе. Побољшана активност се може приписати високом антиоксидативном капацитету хидрогелова (више од 90% за неке узорке, слика **61(a и б))**, који не само да смањује оксидативни стрес, већ и стабилизује протеинске структуре чиме спречава денатурацију. Пошто прекомерна количина ROS делује као кључни медијатор у каскади инфламаторног процеса, њихова неутрализација



антиоксидативним састојцима хидрогелова могла би да ублажи низводне инфламаторне токове, што би на крају допринело заштити протеина и укупном анти-инфламаторном ефекту. Узета заједно, описана својства указују на то да тестирани хидрогелови представљају обећавајући избор за биомедицинске примене, посебно у лечењу хроничних рана и других стања повезаних са упалом, где оксидативни стрес игра кључну улогу.

4.5.3.2 Анти-инфламаторна активност хидрогелова са наночестицама злата

Већ је речено да формиран хидрогелови показују анти-инфламаторне ефекте кроз вишеструке механизме, као што су неутрализација слободних радикала, неутрализација инфламаторних молекула и утицај на активност имуних ћелија. Хидрогелови могу бити дизајнирани тако да испоруче анти-инфламаторне лекове или да садрже у себи једињења која природно поседују анти-инфламаторна својства (Huang et al., 2022). Анти-инфламаторна активност формиран хидрогелова са наночестицама злата у односу на албумин говеђег серума дата је у табели 44.

Табела 44. Анти-инфламаторна активност хидрогелова са наночестицама злата на албумин говеђег серума (BSA)

Узорак	Температура складиштења	Инхибиција (%)
Blank	22 °C	78,87±0,00832
X-KP CT	22 °C	79,17±0,00874
X-KP 80	4 °C	76,51±0,01560
Диклофенак-натријум		95,60±0,00100

Скраћенице су дате у табели 31

Као што је приказано у табели 44, сви тестирани хидрогелови показали су сличне ефекте на говеђи серумски албумин (BSA) у поређењу са контролним (Blank) хидрогелом. Примећено је да је узорак хидрогела складиштен на $T = 22\text{ °C}$, који садржи AuNPs-E синтетисане на собној температури и стабилизоване екстрактом листа купине добијеним рефлукс екстракцијом (X-KP CT), показао највећи заштитни ефекат са процентом заштите од $79,17\pm0,00874\%$. Насупрот томе, хидрогел складиштен на $T = 4\text{ °C}$ показао је нижи заштитни ефекат од blank узорка при концентрацији од $0,1\text{ mgcm}^{-3}$. Приказани резултати су у сагласности са резултатима антиоксидативне активности где је само узорак X-KP CT, складиштен на $T = 22\text{ °C}$, показао значајну способност неутрализације слободних радикала. Поред тога, ови резултати се поклапају са претходним резултатима (поглавље 4.3.1.2; Tasić et al., 2026), који показују да је X-KP

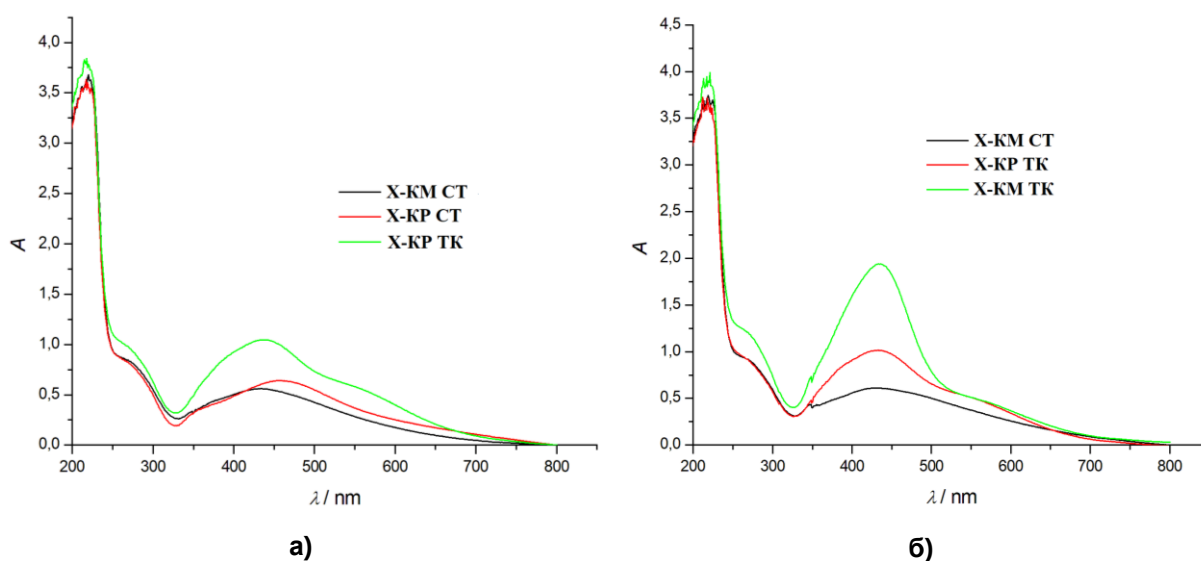


СТ хидрогел са AgNPs-E, складиштен на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, показао најизраженији заштитни ефекат на BSA. Хемијски профил биљног екстракта, заједно са техником екстракције и условима синтезе наночестица, игра кључну улогу у одређивању својстава и ефикасности финалног наноматеријала. Верује се да су фенолна једињења и флавоноиди, између осталих фитохемикалија, главни доприносиоци овој активности због њихове двоструке функције као редукционих и стабилизационих средстава (Ahmed et al., 2018; Shoults-Wilson et al., 2011; Usman et al., 2024). Ови фактори заједно истичу важност одабира одговарајућих биолошких извора и метода синтезе у зеленој нанотехнологији.

4.6 Фотопротективни потенцијал хидрогелова

4.6.1 Фотопротективни потенцијал хидрогелова са наночестицама сребра

Фотопротективни потенцијал неких хидрогелова формираних са AgNPs-E проверен је одређивањем заштитног фактора (*Sun Protection Factor*, SPF) и других UV-параметара: критичне таласне дужине (λ_c), UVA Star вредности, индекса безбедности наночестица (NS) и UVA/UVB односа. Параметри су одређени на основу UV-Vis спектра хидрогелова (сл. 63), снимљених директно, у виду равномерног танког филма дебљине 4 mm, између кварцних плочица.



Слика 63. UV-Vis апсорпциони спектри хидрогелова са наночестицама сребра складиштених 365 дана на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (а) и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (б), у мраку. Скраћенице су дате испод табеле 20



Фактор заштите од сунчевог зрачења (SPF), λ_c , UVA Star вредности, NS и UVA/UVB однос одређени су методама које су описали Diffey (1994) и Dutra и сарадници (2004) користећи снимљене спектре директно из слоја хидрогела дебљине 4 mm и из раствора, а резултати су дати у табели 45.

Табела 45. SPF и UV параметри (λ_c , NS, UVA Star вредности и UVA/UVB однос) хидрогелова са наночестицама сребра складиштених 365 дана на различитим температурама ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$), у мраку

Температура складиштења					
$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$					
Хидрогел	SPF слој (раствор)	λ_c (nm)	NS	UVA Star	UVA/UVB
Х-КР ТК	13,63 (14,48)	393	4	4	1,956
Х-КМ СТ	11,98 (12,84)	391	4	3	1,395
Х-КР СТ	10,43 (11,71)	390	4	4	1,415
$T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$					
Х-КР ТК	12,45 (14,30)	393	4	4	2,097
Х-КМ СТ	13,00 (11,89)	391	4	4	1,490
Х-КМ ТК	16,03 (17,94)	394	4	4	2,496

Скраћенице су дате у табели 20

Израчунате вредности SPF-а, у распону од 10,43 до 16,03, указују на умерен ниво заштите од UVB зрачења. Вредности SPF-а одређене на основу спектра снимљених помоћу обе методе (слој или раствор хидрогела) имају приближне вредности (таб. 45) што сугерише да се SPF може одређивати на било који од описаних начина, тј. да су наночестице у хидрогелу практично у воденој средини и да се ефекат разблаживања не рефлектује у значајној мери на коначни исход. Приметно је да вредности SPF-а остају приближно исте на различитим температурама складиштења, што указује на солидну термичку стабилност хидрогелова у погледу фотопротективне ефикасности. У одсуству директно упоредивих публикација фокусираних на хидрогелове засноване на овој специфичној матрици карбомер – AgNPs-E, резултати су размотрени кроз поређење са сличним системима описаним у литератури. Студија Ghazwani и сарадника (2023), у којој су AgNPs коформулисане са метил антранилатом (МА), познатим органским UV апсорбером, показала је да је систем постигао SPF од 9,81 што је упоредиво са



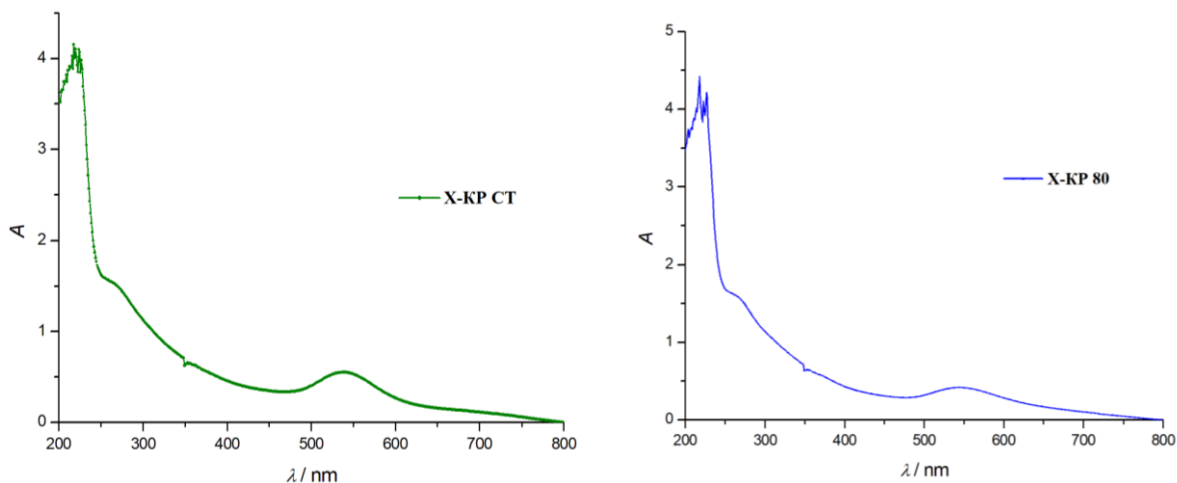
вредностима добијеним у овом раду. Треба имати у виду синергијски UV-апсорбујући ефекат самог МА, који ефикасно апсорбује UV зрачење због своје ароматичне структуре. Насупрот томе, формулације развијене у овом раду су се ослањале искључиво на фотопротективна својства самих AgNPs-E унутар карбомер-хидрогел матрице, без укључивања конвенционалних органских UV филтера.

UVA звезде, које процењују степен UVA заштите, су високе код већине узорка постижући оцену 4. Изузетак је примећен код X-КМ СТ узорка складиштеног на $T = 4$ °C, који је показао мању оцену за јединичну вредност. Упркос томе, укупни UVA/UVB односи, који су се кретали од 1,395 до 2,496, указују на тренд ка уравнотеженој и широкоспектралној фотопротекцији. Ови односи, посебно они који прелазе вредност од 1,4, показују ефикасну покривеност у UVA и UVB регионима, што је додатно потврђено вредностима критичне таласне дужине (λ_c) између 391 и 393 nm. Вредности λ_c изнад 370 nm се генерално сматрају показатељима заштите широког спектра, а оне које се приближавају 400 nm указују на јаке могућности апсорпције UVA зрачења (Diffey, 1994; Dutra et al. (2004)).

Формирани хидрогелови у себи носе фундаменталну разлику у односе на већину осталих, која истиче њихову кључну снагу, али и ограничења. Наиме, одсуство традиционалних UV филтера побољшава биокомпатибилност и смањује потенцијал за иритацију коже или контаминацију околине, али у исто време условљава ниже укупне SPF вредности. Међутим, високи UVA/UVB односи, UVA star вредности и конзистентне критичне таласне дужине, истичу потенцијал AgNPs-E хидрогелова као ефикасног фотопротективног средства, посебно у формулацијама које теже покривеношћу широког спектра са минималном употребом адитива. Дакле, тестирани хидрогелови показују обећавајућу UVA заштиту и термичку стабилност, иако њихова UVB заштита остаје умерена. Ови резултати пружају вредну основу за даљу оптимизацију формулација, посебно кроз потенцијалну интеграцију додатних биокомпатибилних UV апсорбујућих средстава, како би се повећао SPF без угрожавања безбедности или једноставности хидрогел система.

4.6.2 Фотопротективни потенцијал хидрогелова са наночестицама злата

UV-Vis спектри одабраних хидрогелова са наночестицама злата, снимани на начин који је описан у претходном поглављу, приказани су на слици 64.



Слика 64. UV-Vis апсорпциони спектри хидрогелова са наночестицама злата складиштени 365 дана на $T = 4\text{ °C}$ (а) и $T = 22\text{ °C}$ (б), у мраку. Скраћенице су дате испод табеле 31

Слично као и за хидрогелове који садрже AgNPs-E, SPF фактор и UV-параметри су приказани у табели 46.

Табела 46. SPF и UV параметри (λ_c , NS, UVA Star вредности и UVA/UVB однос) хидрогелова са наночестицама злата складиштених 365 дана на различитим температурама ($T = 4\text{ °C}$ и $T = 22\text{ °C}$), у мраку

Температура складиштења					
$T = 4\text{ °C}$					
Хидрогел	SPF слој (раствор)	$\lambda_c(\text{nm})$	NS	UVA Star	UVA/UVB
X-KP CT	26,98 (21,74)	389	4	3	1,146
$T = 22\text{ °C}$					
X-KP 80	27,37 (29,53)	383	4	2	1,127

Скраћенице су дате у табели 31

Фотопротективне перформансе ових формулација су процењене на сличан начин као код AgNPs-E хидрогелова. Вредности SPF-а износе 26,98 за X-KP CT и 27,37 за X-KP 80, што указује на задовољавајућ ниво заштите од UVB зрачења. У поређењу са AgNPs-E хидрогеловима (таб. 45), формулације са наночестицама злата показале су значајно више вредности SPF-а. Резултати не показују значајне разлике у зависности од услова складиштења. Међутим, у погледу UVA заштите, уочено је да се UVA Star вредности смањују при вишој температури складиштења, што указује на нешто слабију UVA ефикасност при датим условима. Критичне таласне дужине и индекс безбедности код



хидрогелова са AuNPs-E (таб. 46) су показале високе и сличне вредности као код хидрогелова са AgNPs-E (таб. 45) сугеришући да се и ове формулације и те како могу сматрати добрим UV протекторима. UVA/UVB односи су генерално нижи у поређењу са AgNPs-E хидрогеловима, али и даље са респектабилним вредностима, што указује на значајан потенцијал у заштити коже од штетног дејства UV зрачења.

Генерално, хидрогелови са AuNPs-E јесу показали значајно веће вредности SPF фактора у односу на хидрогелове са AgNPs-E, али су остали параметри, који се односе на потенцијал формулација као UV протектора, наклоњени хидрогеловима са AgNPs-E. У сваком случају, потенцијал ових формулација у погледу наведених активности је несумњив и сигурно ће бити предмет интересовања и опсежнијих истраживања у будућем раду, посебно у смислу фотостабилности формулација под дејством UV зрачења различитих таласних дужина.



5 ЗАКЉУЧАК

UV-Vis спектрофотометријска анализа наночестица сребра и злата

- На основу UV-Vis спектра може се закључити да су формиране AgNPs-E показале високу стабилност током дужег временског периода на собној температури, у мраку, будући да SPR траке нису трпеле промене. Примећено је да екстракт купине дао равномерније AgNPs-E, са релативно уском дистрибуцијом величине у поређењу са екстрактом малине, што је узето у обзир приликом селекције честица за даља истраживања.
- Синтеза при температури кључања доводи до формирања AgNPs-E мањих величина (27 и 18 nm за КР ТК и ММ ТК, респективно) у поређењу са наночестицама синтетисаним на собној температури (43 и 42 nm за КМ СТ и МР СТ, респективно).
- SPR трака КМ СТ наночестица је шира, са благо назначеним раменом на већим таласним дужинама, што сугерише нижу униформност формираних наночестица, па чак и несферичан облик у извесној мери. Овај ефекат је посебно уочљив код МР ТК наночестица, док су AgNPs-E у МР СТ и КМ ТК суспензијама хомогенијег облика са правилнијом дистрибуцијом величине.
- Када су AuNPs-E у питању, спектри илуструју да су екстракти из листа купине дали стабилније наночестице у поређењу са екстрактима из листа малине, што је дало предност екстрактима из листа купине (добијених мацерацијом на собној температури и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања) за даља истраживања.
- Појава широке SPR траке указује на формирање AuNPs-E наночестица различитих облика (штапићастих, троугластих и правоугаоних), што је потврђено и SEM анализом.
- У поређењу са AgNPs-E, синтеза AuNPs-E употребом истих екстраката траје краће, што се објашњава већим редукционим потенцијалом злата (Au^{3+}) у односу на сребро (Ag^+), тј. долази до брже редукције злата и формирања стабилних наночестица применом истих екстракта.



FT-IR спектrophотометријска анализа наночестица сребра и злата

- Функционалне групе полифенола, протеина, гликозида, алкохола, терпеноида, полисахарида, полиола итд. су идентификоване као потенцијални редукциони и стабилизациони структурни мотиви биомолекула пореклом из водених екстраката листова малине и купине.
- Значајно смањење интензитета трака у спектрима AgNPs-E и AuNPs-E, у поређењу са спектрима самих екстраката, сугерише да у редукцији Ag^+ и Au^{3+} јона, и стабилизацији формираних наночестица, учествују горе наведени молекули који садрже функционалне групе са кисеоником и азотом (NH , $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$, CNO , $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и OH).

XRD анализа наночестица сребра и злата

- Резултати XRD анализе су показали да пикови синтетисаних AgNPs-E и AuNPs-E наночестица одговарају равнима рефлексије који указују на присуство површински центриране кубне кристалне решетке, са доминантним пиком који одговара кристалографској (111) равни рефлексије.
- Просечна величина кристалита испитиваних AgNPs-E била је у распону од 18,0 – 21,1 nm. Приближно иста величина наночестица код свих узорака (KM CT, KM TK, KP CT и KP TK) указује на то да техника екстракције и услови синтезе не утичу значајно на њихову кристалографску структуру и величину, као и то да формирање и раст наночестица редукцијом Ag^+ јона највише зависи од врсте стабилизационих агенаса.
- Просечна величина кристалита синтетисаних AuNPs-E била је у опсегу 12,3 – 18,7 nm, што је у складу са величином других AuNP стабилизованих биљним екстрактима код којих је величина кристалита одређена сличном методом.

SEM анализа наночестица сребра и злата

- Резултати SEM анализе су показали да синтетисане AgNPs-E имају претежно сферни облик, иако је уочен и мањи број честица са кубичном морфологијом.



Током процеса зелене синтезе, облик наночестица је остао уједначен, што указује на контролисане услове реакције.

- SEM микрографије показују да су синтетисане AuNPs-E углавном облика коцке, уз присуство мање заступљених троугластих и штапићастих наночестица.

EDX анализа наночестица сребра и злата

- Синтеза AgNPs-E на собној температури, уз употребу екстракта листа купине добијеног мацерацијом на собној температури, се показала као најефикаснија на основу EDX анализе.
- Блажи услови екстракције и синтезе одговарају споријој, али ефикаснијој, редукцији и синтези AgNPs-E која за последицу има већи проценат редукованог и у честицама „заробљеног“ сребра.
- Проценат елементарног злата био је највећи у узорку КМ 80, а најмањи у узорку КМ СТ. Ово потврђује већу ефикасност синтезе AuNPs-E на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, коришћењем екстракта из листа купине добијеног мацерацијом на собној температури, што сугерише на већу ефикасност синтезе при енергичнијим условима.

DLS анализа и zeta-потенцијал наночестица сребра и злата

- AgNPs-E синтетисане под блажим условима синтезе, користећи екстракт добијен на собној температури, показале су већу стабилност у односу на оне синтетисане на температури кључања. Блажи услови екстракције и синтезе у већој мери чувају биомолекуле који стабилизују наночестице.
- AuNPs-E имају мању негативну вредност zeta-потенцијала у поређењу са AgNPs-E, што указује на чињеницу да су синтетисане AuNPs-E умерено и мање стабилне у поређењу са AgNPs-E.
- DLS анализа је показала веће вредности просечне величине AgNPs-E и AuNPs-E у односу на XRD анализу. XRD одређује величину самих кристалита који су уређени региони унутар саме наночестице, тј. само метално језгро наночестице. Насупрот томе, DLS мери укупну величину наночестица, укључујући димензије свих околних агенаса (биомолекула) за „затварање“ тј. стабилизацију, заједно са



самим металним језгром. Ова чињеница, тј. разлика у величини честица мерена наведеним методама, представља још један посредан доказ да су биомолекули из екстраката фиксирани са спољне стране честица формирајући тзв. затварајући и стабилизациони слој.

UHPLC-MS анализа наночестица сребра и злата

- Анализом екстраката, и супернатаната након центрифугирања синтетисаних наночестица, доказано је да биомолекули из екстраката учествују у формирању и стабилизацији AgNPs-E путем редукције Ag⁺ јона. Присутна једињења показала су различиту реактивност у датом систему у зависности од њихове структуре. Додатне функционалне групе у структури, као што је хидроксилна група, фаворизују молекул у реакцијама редукције јона метала.
- Кверцетин глукуронид и кемпферол-3-*O*-(хидрокси-3-метилглутарни-хексозид) учествују у редукцији Ag⁺ јона, тј. формирању и стабилизацији AgNPs-E, у много већој мери у поређењу са кемпферол-3-глукуронидом и лутеолин-7-*O*-глукозидом. Фенолне киселине из екстраката значајно утичу у редукцији и стабилизацији формираних наночестица.

Антиоксидативна активност наночестица сребра и злата

- AgNPs-E су показале приближно десет пута већу антиоксидативну активност од чистих екстраката. AgNPs-E синтетисане на температури кључања, употребом екстракта малине добијеног мацерацијом, показале су највећу антиоксидативну активност.
- AgNPs-E синтетисане употребом екстракта јагоде показале су за ред величине слабију антиоксидативну активност у поређењу са наночестицама синтетисаним употребом екстраката малине и купине.
- AuNPs-E синтетисане на собној температури, употребом екстракта листа купине добијеним екстракцијом уз рефлукс, показале су највећу антиоксидативну активност у поређењу са осталим наночестицама злата.
- AuNPs-E синтетисане коришћењем екстраката добијених екстракцијом уз рефлукс показале су већу антиоксидативну активност у поређењу са



наночестицама синтетисаним коришћењем екстракта добијеног мацерацијом, што сугерише да је рефлукс екстракција ефикаснија у смислу изолације биоактивних једињења, дајући AuNPs-E са већом антиоксидативном активношћу.

- AgNPs-E су показале јачу антиоксидативну активност у свим упоредивим случајевима у односу на AuNPs-E. Униформнији сферни облик AgNPs-E и релативно мања стабилност сребра у погледу губитка електрона могу бити објашњење јаче антиоксидативне активности AgNPs-E у односу на AuNPs.
- Имајући у виду резултате антиоксидативне активности, као и стабилности наночестица праћене методом UV-Vis спектроскопије, дата је предност AgNPs-E и AuNPs-E стабилизованим воденим екстрактима листа купине (мацератом и екстрактом добијеним екстракцијом уз рефлукс) у формирању хидрогелова као финалног производа пројектованог у оквиру циљева ове дисертације.

Антимикробна активност наночестица сребра и злата

- AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта јагоде показале су значајно већу активност против Gram-позитивних бактерија у односу на активност против Gram-негативних бактерија. *E. Coli* је једино показала сензибилност на дејство AgNPs-E од свих тестираних Gram-негативних бактерија.
- AgNPs-E синтетисане употребом воденог екстракта јагоде показале су шири спектар антимикробне активности у поређењу са чистим екстрактом. У исто време, AgNPs-E синтетисане на собној температури показале су нешто већу антимикробну активност у поређењу са наночестицама синтетисаним на температури кључања.
- AgNPs-E синтетисане екстрактима из листа купине и малине су такође показале већу антимикробну активност у поређењу са самим екстрактима. Највећу антимикробну активност показале су AgNPs-E синтетисане на температури кључања помоћу екстракта купине добијеног екстракцијом уз рефлукс.
- Услови синтезе имају значајан утицај на крајњу биолошку активност, при чему наночестице синтетисане на повишеној температури (температура кључања) показују бољу антимикробну ефикасност, што имплицира да овакви услови погодују формирању стабилнијих и активнијих наноструктура.



- AuNPs-E су показале знатно слабију антимикуробну активност у поређењу са AgNPs-E. *P. aeruginosa* се показао као једини бактеријски сој сензитиван на тестиране AuNPs-E.
- AuNPs-E синтетисане на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, употребом екстракта листа купине добијеног рефлукс екстракцијом, су једино показале активност против Gram-позитивних бактерија.

Цитотоксична активност наночестица сребра in vitro

- AgNPs-E су показале концентрациону зависност на HeLa и MDCK ћелијским линијама и ефекат на вијабилност ћелија који је специфичан за ћелијску линију, што је процењено МТТ тестом.
- Добијени резултати показују да се AgNPs-E синтетисане екстрактом листа јагоде могу користити као сировина у производњи фармацеутских препарата за потенцијалну примену на кожи, али у дефинисаним и безбедним концентрацијама (нижим од $0,015\text{ mgcm}^{-3}$).

Физичко-хемијске карактеристике хидрогелова са наночестицама сребра и злата

Промена вискозности хидрогелова

- Промене вискозности хидрогелова биле су минималне што сугерише да мрежа хидрогела није значајно нарушена током чувања, те да су интеракције између полимерних ланаца и наночестица метала стабилне.
- Нижа температура складиштења се показала као погоднија за очување стабилности хидрогелова, што је у складу са очекивањем да смањена термичка енергија успорава агрегацију и деградацију компоненти хидрогела.
- Разлике између хидрогелова са AgNPs-E и AuNPs-E у погледу вискозности нису биле значајне. Ипак, формулације са AuNPs-E имају мање осцилације у поређењу са еквивалентним формулацијама са AgNPs-E, нарочито при складиштењу на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. То сугерише да AuNPs-E наночестице доприносе бољој структурној стабилизацији мреже хидрогела, вероватно услед њихове већ познате хемијске инертности и слабије склоности ка оксидацији у односу на Ag.
- Хидрогелови са екстрактима листа купине добијеним мацерацијом (KM) показали су израженије флукуације кроз време, посебно у варијанти X-KM ТК



(синтеза наночестица на температури кључања употребом мацерата). Ово указује да мацерација вероватно обезбеђује мање стабилну фракцију биоактивних компоненти купине које не доприносе дугорочној стабилности система. Насупрот томе, хидрогелови са екстрактима добијеним уз рефлукс (КР) показали су стабилније профиле вискозитета, што сугерише да интензивнији услови екстракције обезбеђују екстракте богатије стабилним фенолним једињењима или полимерима који остварују бољу стабилизацију мреже у присуству наночестица.

- Хидрогелови са наночестицама синтетисаним на собној температури (СТ) показују већу стабилност у односу на оне са наночестицама синтетисаним на температури кључања (ТК). Посебно се истакла Х-КР СТ формулација, код које су осцилације биле минималне током периода складиштења од годину дана. Ово сугерише да блажи услови синтезе наночестица омогућавају очување интегритета екстрактивних молекула и спречавају деструкцију компонената које доприносе формирању стабилне хидрогелне мреже.
- Кључни фактори за дугорочну стабилност хидрогелова у погледу вискозности идентификовани су у употреби наночестица синтетисаних на собној температури помоћу екстракта из листа купине добијеног рефлукс екстракцијом (Х-КР СТ), и складиштењу на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Промена рН вредности хидрогелова

- рН вредности су показале благи пад, нарочито у каснијим временским тачкама (180 – 365 дана), али су остале унутар опсега $\sim 4,8 - 5,4$, што значи да нема драматичног закишељавања или дестабилизације током периода складиштења. Ово сугерише спору киселинску деградацију или ослобађање слабих киселих компоненти из матрикса, иако је пад рН вредности остао у врло уским границама.
- Формулације чуване на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ су показале стабилније рН вредности, са мањим одступањима током времена, док су узорци чувани на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ били склонији израженијем паду рН вредности. Ово потврђује да је хладно складиштење неопходно за очување хемијске стабилности и успоравање разградних процеса.



- Разлике између хидрогелова са AgNPs-E и AuNPs-E у погледу рН вредности биле су мале, али су формулације са AuNPs-E показале нешто конзистентније вредности рН током времена, нарочито у узорцима чуваним на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Хидрогелови са екстрактима добијеним екстракцијом уз рефлукс (Х-КР) генерално показују стабилнији рН профил него они са мацератима (Х-КМ). У КМ варијантама (посебно Х-КМ СТ) бележи се израженији пад рН вредности током времена.
- Хидрогелови са наночестицама синтетисаним на собној температури показују конзистентнији рН током времена, док хидрогелови са наночестицама синтетисаним на температури кључања показују нешто веће осцилације и бржи пад рН вредности током складиштења.
- Оптимална формулација за дугорочну стабилност рН вредности је припрема хидрогелова употребом наночестица синтетисаних на собној температури употребом екстракта из листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (Х-КР СТ), уз складиштење хидрогелова на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. AuNPs-E имају благу предност у очувању стабилности у односу на AgNPs-E.

Промена електричне проводљивости хидрогелова

- Проводљивост је показала нешто више осцилација од вискозитета и рН, нарочито код формулација са сребром. Ипак, и овде су вредности остале у стабилном опсегу, без прогресивног раста или пада. То значи да јонски баланс у хидрогелној мрежи није значајно нарушен, што је нарочито важно за биомедицинску примену.
- Формулације чуване на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ су се показале као стабилније у погледу проводљивости у односу на оне чуване на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Проводљивост на вишим температурама складиштења показује израженије одступање код хидрогелова са AgNPs-E.
- Системи са AuNPs-E показују конзистентније профиле проводљивости током времена. Насупрот томе, формулације са AgNPs-E имају израженије осцилације, што се може повезати са познатом реактивношћу сребра (ослобађање Ag^+ јона и оксидација).



- Формулације са екстрактима добијеним уз рефлукс (Х-КР) показују стабилнији тренд проводљивости у односу на формулације са мацератима (Х-КМ). У Х-КМ ТК и Х-КМ СТ групама видљив је нешто израженији пад или осцилације проводљивости, што сугерише да биоактивни молекули добијени мацерацијом немају једнак капацитет да стабилизују јонско окружење у хидрогелу.
- Хидрогелови са наночестицама синтетисаним на собној температури су генерално показали стабилније профиле проводљивости у односу на профиле хидрогелова са наночестицама синтетисаним на температури кључања.
- Оптимална формулација у погледу проводљивости је припрема хидрогелова употребом наночестица синтетисаних на собној температури употребом екстракта из листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (Х-КР СТ), уз складиштење хидрогелова на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, што је у складу са резултатима за вискозитет и рН. AuNPs-E и овде имају благу предност у очувању проводљивости у односу на AgNPs-E.

Може се сумирати да је праћењем вискозитета, рН вредности и електричне проводљивости потврђено да развијени хидрогелови представљају стабилне системе током једногодишњег складиштења у мраку, на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Промене свих испитиваних параметара кретале су се у уским границама, што указује на очување структурног и хемијског интегритета формулација.

Као најповољнија комбинација идентификован је Х-КР СТ хидрогел формиран од наночестица синтетисаних на собној температури, употребом воденог екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, и складиштен на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ова комбинација обезбеђује највиши степен дугорочне стабилности и може се сматрати оптималном за даљу биомедицинску примену. У контексту стабилности формулације мала предност је дата наночестицама злата, док са аспекта биолошке активности наночестице сребра имају несумњиву предност.

Органолептичке карактеристике и биолошка активност хидрогелова



- Након годину дана складиштења на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, хидрогелови су показали лаку мазивост, ефикасну апсорпцију у кожи, благи сјај након наношења и нелепљиву текстуру.
- Контролни хидрогел је остао безбојан и без мириса, што је у складу са очекивањима за матрицу без активних компоненти. Са друге стране, формулације са AgNPs-E и AuNPs-E задржале су неутралан мирис, али су показале зелену или светло-смеђу боју и љубичасту боју, респективно.
- Хидрогел са AgNPs-E, синтетисаним на собној температури употребом екстракта листа купине добијеног екстракцијом уз рефлукс (X-KP CT), показао је највећу антиоксидативну активност мерену DPPH тестом међу хидрогеловима складиштеним на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, што треба посматрати у светлу горе наведених закључака везаних за стабилност и фаворизовану позицију ове формулације.
- Хидрогел са AuNPs-E, синтетисаним на $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и стабилисаним екстрактом листа купине добијеним екстракцијом уз рефлукс (X-KP 80), складиштен на $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, показао је највећу антиоксидативну активност мерену DPPH тестом.
- Од хидрогелова са AuNPs-E који су складиштени на $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, само је X-KP CT показао способност да неутралише више од 50% DPPH радикала, што опет треба посматрати у светлу горе наведених закључака везаних за стабилност ове формулације.
- Формулације хидрогелова са AgNPs-E и AuNPs-E су показале анти-инфламаторни потенцијал која се може приписати антиоксидативном капацитету хидрогелова који не само да смањује оксидативни стрес, већ и стабилизује протеинске структуре чиме спречава денатурацију.
- Хидрогел са AuNPs-E, синтетисаним на собној температури и стабилизованим екстрактом листа купине добијеним екстракцијом уз рефлукс (X-KP CT), показао највећи анти-инфламаторни ефекат, што је у сагласности са горе наведеним закључцима везаним за стабилност и антиоксидативну активност овог хидрогела.

Може се сумирати да је X-KP CT хидрогел, у претходном поглављу истакнут као најповољнији по питању стабилности, показао предност у односу на остале хидрогелове и по питању биолошке активности – антиоксидативне и анти-инфламаторне. Издвојени X-KP CT хидрогел показује значајне активности у



комбинацији са наночестицама злата и сребра, на температури складиштења $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Имајући ово у виду, може се закључити да X-KP CT хидрогел несумњиво представља најповољнију комбинацију коју треба максимално експлоатисати у даљим истраживањима везаним за конкретне апликације.

Фотопротективни потенцијал хидрогелова са наночестицама сребра и злата

- Одсуство традиционалних UV филтера побољшава биокомпатибилност и смањује потенцијал за иритацију коже или контаминацију околине, са задовољавајућим SPF вредностима добијених хидрогелова (у распону од 10,43 до 16,03 и 26,98 до 27,37, за хидрогелове са AgNPs-E и AuNPs-E, респективно).
- Високи UVA/UVB односи, број UVA звездица и конзистентне критичне таласне дужине истичу потенцијал хидрогелова са AgNPs-E као ефикасног фотопротективног средства, посебно у формулацијама које теже покривеношћу широког спектра са минималном употребом адитива.
- Вредности критичне таласне дужине (λ_c) изнад 370 nm се генерално сматрају показатељима заштите широког спектра, а оне које се приближавају 400 nm, као што је случај са хидрогеловима формираним у овом раду, указују на јаке могућности апсорпције UVA зрачења.
- Хидрогелови са AuNPs-E су показали значајно веће вредности SPF фактора у односу на хидрогелове са AgNPs-E, док су остали параметри, који се односе на потенцијал формулација као UV протектора, наклоњени хидрогеловима са AgNPs-E.
- Тестирани хидрогелови показују обећавајућу UVA заштиту и термичку стабилност, док њихова UVB заштита остаје умерена. Ови резултати пружају вредну основу за даљу оптимизацију формулација, посебно кроз потенцијалну интеграцију додатних биокомпатибилних UV апсорбујућих средстава како би се повећао SPF без угрожавања безбедности или једноставности хидрогел система.



6 ЛІТЕРАТУРА

- Abbas R., Luo J., Qi X., Naz A., Khan I.A., Liu H., Yu S., Wei J., Silver Nanoparticles: Synthesis, Structure, Properties and Applications, *Nanomaterials*, 14 (2024), pp. 1425.
- Abdellatif A.A.H., Mohammed H.A., Abdulla M.H., Alsubaiyel A.M., Mahmood A., Samman W.A., Alhaddad A.A., Al Rugaie O., Alsharidah M., Vaali-Mohammed M.A., Al Hassan N., Taha H.H. Green synthesized silver nanoparticles using the plant-based reducing agent *Matricaria chamomilla* induce cell death in colorectal cancer cells, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 27(20) (2023), 10112 – 10125.
- Adak N., Heybeli N., Ertekin C., Infrared drying of strawberry, *Food Chemistry*, 219 (2017), 109 – 116.
- Afaq F., Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(2) (2011), 144 – 151.
- Afaq F., Mukhtar H., Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63 (2001), 61 – 69.
- Afshinnia K., Baalousha M., Effect of phosphate buffer on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles induced by monovalent and divalent electrolytes, *Science of The Total Environment*, 581 (2017), 268 – 276.
- Agarwal H., Nakara A., Shanmugam V.K., Anti-Inflammatory Mechanism of Various Metal and Metal Oxide Nanoparticles Synthesized Using Plant Extracts: A Review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109 (2019), 2561 – 2572.
- Agarwala, Electrically Conducting Hydrogels for Health care: Concept, Fabrication Methods, and Applications, *International Journal of Bioprinting*, 6(2) (2020), pp. 273.
- Ahmad T., Bustam M.A., Irfan M., Moniruzzaman M., Asghar H.M.A., Bhattacharjee S., Mechanistic investigation of phytochemicals involved in green synthesis of gold nanoparticles using aqueous *Elaeis guineensis* leaves extract: Role of phenolic compounds and flavonoids, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(4) (2019), 698 – 708.
- Ahmad T., Bustam M.A., Zulfigar M., Moniruzzaman M., Idris A., Iqbal J., Asghar H.M.A., Ullah S., Controllable phytosynthesis of gold nanoparticles and investigation of their size and morphology-dependent photocatalytic activity under visible light, *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*, 392 (2020), pp. 112429.



- Ahmad Z., Salman S., Khan S.A., Amin A., Rahman Z.U., Al-Ghamdi Y.O., Akhtar K., Bakhsh E.M., Khan S.B., Versatility of Hydrogels: From Synthetic Strategies, Classification, and Properties to Biomedical Applications, *Gels*, 8 (2022), pp. 167.
- Ahmed E.M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of Advanced Research*, 6(2) (2015), 105 – 121.
- Ahmed M.J., Murtaza G., Mehmood A. Bhatti T.M., Silver nanoparticles, green synthesis: characterization, *in vitro* antioxidant and antimicrobial study, *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, (2019), 240 – 248.
- Ahmed S. Kaur G., Sharma P., Singh S., Ikram S., Fruit waste (peel) as bio-reductant to synthesize silver nanoparticles with antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities, *Journal of Applied Biomedicine*, 16(3) (2018), 221 – 231.
- Ahmed S., Ahmad M., Swami B. L., Ikram S., A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1) (2016), 17 – 28.
- Ahmed S., Ahmad S.M., Swami B.L., Ikram S., Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1) (2016), 1 – 7.
- Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A., Hull M., Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends, *Occupational Medicine*, 56 (2006), 300-306.
- Ajitha B., Reddy A.K., Rajesh K.M., Reddy, P.S., *Sesbania grandiflora* leaf extract assisted green synthesis of silver nanoparticles: Antimicrobial activity, *Materials Today: Proceedings*, 3(6) (2016), 1977 – 1984.
- Ajitha B., Reddy Y.A.K., Reddy, P.S., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract, *Materials Science and Engineering: C*, 49 (2015), 373 – 381.
- Akhar M.F., Hanif M., Ranjha N.M., Methods of synthesis of hydrogels ... A review, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5) (2016), 554 – 559.
- Akšić M.F., Zagorac D.D., Sredojević M., Milivojević J., Gašić U., Meland M., Natić M., Chemometric characterization of strawberries and blueberries according to their phenolic profile: Combined effect of cultivar and cultivation system, *Molecules*, 24 (2019), pp. 4310.
- Akter S., Lee S.-Y., Siddiqi M. Z., Balusamy S. R., Ashrafudoulla M., Rupa E. J., Huq M.A., Ecofriendly Synthesis of Silver Nanoparticles by *Terrabacter humi* sp. nov. and Their



- Antibacterial Application against Antibiotic-Resistant Pathogens, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24) (2020), pp. 9746.
- Al Abboud M.A., Mashraqi A., Qanash H., Gattan H.S., Felemban H.R., Alkorbi F., Alawlaqi M.M., Abdelghany T.M., Moawad H., Green biosynthesis of bimetallic ZnO@AuNPs with its formulation into cellulose derivative: biological and environmental applications, *Bioresources and Bioprocessing*, 11(60) (2024), 1 – 14.
- Al Baloushi K.S.Y., Senthilkumar A., Kandhan K., Subramanian R., Kizhakkayil J., Ramachandran T., Shehab S., Kurup S.S., Alyafei M.A.M., Al Dhaheri A.S., Jaleel A., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Moringa Peregrina* and their toxicity on MCF-7 and Caco-2 human cancer cells, *International Journal of Nanomedicine*, 19 (2024), 3891 – 3905.
- Alam F., Nag M., Judder M.I., Mandal S., Shrestha B., Ghosh A., Dutta A., Roy S., Islam M., Eco-Compatible Synthesis of Metal Nanoparticles: Influencing Parameters, Characterization, Advancement and Applications, *Asian Journal of Chemistry*, 37(11) (2025), 2617 – 2626.
- Alam M.N., Das S., Batuta S., Roy N., Chatterjee A., Mandal D., Begum N.A., *Murraya koenigii* Spreng. leaf extract: An efficient green multifunctional agent for the controlled synthesis of Au nanoparticles, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2 (2014), 652 – 664.
- Alavi M., Karimi N., Characterization, antibacterial, total antioxidant, scavenging, reducing power and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles using *Artemisia haussknechtii* leaf extract, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(8) (2018), 2066 – 2081.
- Alcázar-Ramírez O.Y., Mendoza-Espinoza J.A., Fragoso-Serrano M., López-Barrera J.A., Pérez-Flores L.J., Green synthesis, chemical characterization, and antiproliferative effect of gold nanoparticles using methanolic extracts of *Chrysophyllum cainito* L. peels, *Journal of Medicinal Food*, (2025), 1 – 10.
- Aldakheel F.M., Sayed M.M.E., Mohsen D., Fagir M.H., El Dein D.K., Green Synthesis of Silver Nanoparticles Loaded Hydrogel for Wound Healing, Systematic Review, *Gels*, 9 (2023), pp. 530.
- Aldakheel R.K., Gondal M.A., Almessiere M.A., Rehman S., Nasr M.M., Alsalem Z., Khan F.A., Spectrochemical analysis using LIBS and ICPOES techniques of herbal medicine (*Tinnevelly Senna* leaves) and its anti-cancerous/antibacterial application, *Arabian Journal of Chemistry*, 14 (2021), pp. 103451.



- Alegria E.C.B.A., Ribeiro A.P.C., Mendes M., Ferraria A.M., Rego A.M.B., Pombeiro A.J.L., Effect of Phenolic Compounds on the Synthesis of Gold Nanoparticles and Its Catalytic Activity in the Reduction of Nitro Compounds, *Nanomaterials*, 8 (2018), pp. 320.
- Alharbi N.S., Alsubhi N.S., Felimban A.I., Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 15 (2022), 109 – 124.
- Ali A., Ahmed S., Recent Advances in Edible Polymer Based Hydrogels as a Sustainable Alternative to Conventional Polymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (2018), 6940 – 6967.
- Alizadeh S.R., Biparva P., Goli H.R., Khan B.A., Ebrahimzadeh M.A., Green Synthesis of AuNPs by *Crocus caspius*— Investigation of Catalytic Degradation of Organic Pollutants, Their Cytotoxicity, and Antimicrobial Activity, *Catalysts*, 13 (2023), pp. 63.
- Allafchian A.R., Mirahmadi-Zare S.Z., Jalali S.A.H., Hashemi S.S., Vahabi M.R., Green synthesis of silver nanoparticles using *phlomis* leaf extract and investigation of their antibacterial activity, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 6 (2016), 129 – 135.
- Almeida A.R., Pinheiro F.A.S.D., Fideles M.G.M., Cunha R.B.L., Confessor V.P.P., Matsui K.N., Paiva W.S., Rocha H.A.O., Ganade G., Espindola L.S., Morais W.A., Ferreira L.S., *Cenostigma bracteosum* Hydroethanolic Extract: Chemical Profile, Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and Gel Formulation Development, *Pharmaceutics*, 17(6) (2025), pp. 780.
- Alshehri S.M., Aldalbahi A., Al-Hajji A.B., Chaudhary A.A., Panhuis M.I.H., Alhokbany N., Ahamad T., Development of carboxymethyl cellulose-based hydrogel and nanosilver composite as antimicrobial agents for UTI pathogens, *Carbohydrate Polymers*, 138 (2016), 229 – 236.
- Al-Yousef H.M., Hassan W.H.B., Abdelaziz S., Amina M., Adel R., El-Sayed M.A., UPLC-ESI-MS/MS profile and antioxidant, cytotoxic, antidiabetic, and antiobesity activities of the aqueous extracts of three different *Hibiscus* species, *Journal of Chemistry*, 2020 (2020), 1 – 17.
- Amendola V., Pilot R., Frasconi M., Marago O.M., Iati M.A., Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20) (2017), pp. 203002.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Oxidants are a major contributor to aging, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663 (1992), 85 – 96.



- Amooaghaie R., Saeri M.R., Azizi M., Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120 (2015), 400 – 408.
- Anandalakshmi K., Venugobal J., Ramasamy V., Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity, *Applied Nanoscience*, 6 (3) (2016), 399 – 408.
- Annamalai A., Christina V.L.P., Sudha D., Kalpana M., Lakshmi P.T.V., Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of AuNPs using *Euphorbia hirta* L. leaf extract, *Colloids Surf. B or Colloids Surf B Biointerfaces*, 108(1) (2013), 60 – 65.
- Annamalai J., Nallamuthu T., Green synthesis of silver nanoparticles: characterization and determination of antibacterial potency, *Applied Nanoscience*, 6 (2016), 259 – 265.
- Ansari S.A., Handbook of Cosmetic Science and Technology, Ed. by André O. Barel, Marc Paye, and Howard I. Maibach, 3rd ed., Informa healthcare, New York, (2009), pp. 221.
- Apréa E., Carlin S., Giongo L., Grisenti M., Gasperi F., Characterization of 14 raspberry cultivars by solid phase microextraction and relationship with gray mold susceptibility, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010), 1100 – 1105.
- Arabpour Z., Abedi F., Salehi M., Baharnoori S.M., Soleimani M., Djalilian A.R., Hydrogel-Based Skin Regeneration, *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (2024), pp. 1982.
- Arshad F., Naikoo G.A., Hassan I.U., Chava S.R., El-Tanani M., Aljabali A.A., Tambuwala M.M., Bioinspired and Green Synthesis of Silver Nanoparticles for Medical Applications: A Green Perspective, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196 (2024), 3636 – 3669.
- Arunachalam K., Sreeja P.S., MTT Assay Protocol. In: Advanced Cell and Molecular Techniques. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY, (2025), 271 – 276.
- Asefian S., Ghavam M. Green and environmentally friendly synthesis of silver nanoparticles with antibacterial properties from some medicinal plants, *BMC Biotechnology*, 24(5) (2024), 1 – 22.
- Asha A.B., Narain R., Nanomaterials properties, Chapter 15, *Polymer Science and Nanotechnology*, (2020), 343 – 359.
- Asif M., Yasmin R., Asif R., Ambreen A., Mustafa M., Umbreen S., Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and their Antibacterial Potential, *Dose Response*, 20(1) (2022), 1 – 11.



- Aslantürk Ö.S., Principles, Advantages, and Disadvantages *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, Chapter 1, Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, (2018), 1 – 18.
- Atkins P., de Paula J., Physical Chemistry. 8h ed. Oxford: Oxford University Press; (2006), 1 – 1053.
- Azad A., Zafar H., Raza F., Sulaiman M., Factors influencing the green synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts: a comprehensive review, *Pharmaceutical Fronts*, 5(3) (2023), 117 – 131.
- Azevedo J.S., Viana Junior N.S., Soares C.D.V., UVA/UVB sunscreen determination by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry, *Il Farmaco, Edizione Scientifica*, 54 (1999), 573 – 578.
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117(4) (2013), 426 – 436.
- Bachelor M.A., Bowden G.T., UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression, *Seminars in Cancer Biology*, 14 (2) (2004), 131 – 138.
- Badhwar R., Mangla B., Neupane Y.R., Khanna K., Popli H., Quercetin loaded silver nanoparticles in hydrogel matrices for diabetic wound healing, *Nanotechnology*, 32 (2021), pp. 505102.
- Bahram M.; Mohseni N.; Moghtader M., An introduction to hydrogels and some recent applications, In *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, IntechOpen: London, UK, (2016), pp. 266.
- Balasubramanian S., Kala S.M.J., Pushparaj T.L., Biogenic synthesis of gold nanoparticles using *Jasminum auriculatum* leaf extract and their catalytic, antimicrobial and anticancer activities, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57 (2020), pp. 101620.
- Baldassarre F., Cacciola M., Ciccarella G., A predictive model of iron oxide nanoparticles flocculation tuning Z-potential in aqueous environment for biological application, *Journal of Nanoparticle Research*, 15 (2015), pp. 377.
- Banerjee P., Satapathy M., Mukhopahayay A., Das P., Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis, *Bioresources and Bioprocessing*, 1(3) (2014), 1 – 10.



- Bar H., Bhui D.K., Sahoo G.P., Sarkar P., De S.P., Misra A., Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*, *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 339.1 (2009), 134 – 139.
- Bar H., Kr. Bhui D., Sahoo G.P., Sarkar P., Pyne S., Misra A., Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348 (2009), 212 – 216.
- Barabadi H., Kobarfard F., Vahidi H., Biosynthesis and Characterization of Biogenic Tellurium Nanoparticles by Using *Penicillium chrysogenum* PTCC 5031: A Novel Approach in Gold Biotechnology, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.*, 17 (2018), 87 – 97.
- Barani H., Montazer M., Samadi N., Toliyat T., *In situ* synthesis of nano silver/lecithin on wool: Enhancing nanoparticles diffusion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92 (2012), 9 – 15.
- Baranwal A., Mahato K., Srivastava A., Maurya P.K., Chandra P., Phytofabricated metallic nanoparticles and their clinical applications, *Royal Society of Chemistry*, 6 (2016), pp. 105996.
- Barclay T.G., Day C.M., Petrovsky N., Garg S., Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 221 (2019), 94 – 112.
- Bardajee G.R., Mizani F., Hosseini S.S., pH sensitive release of doxorubicin anticancer drug from gold nanocomposite hydrogel based on poly(acrylic acid) grafted onto salep biopolymer, *Journal of Polymer Research*, 24 (2017), pp. 48.
- Baruah D., Goswami M., Yadav R.N.S., Yadav A., Das A.M., Biogenic synthesis of gold nanoparticles and their application in photocatalytic degradation of toxic dyes, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 186 (2018), 51 – 58.
- Basavegowda N., Idhayadhulla A., Lee Y.R., Phyto-synthesis of gold nanoparticles using fruit extract of *Hoveniadelphicis* and their biological activities, *Industrial Crops and Products*, 52 (2014), 745 – 751.
- Bayat M., Zargar M., Astarkhanova T., Pakina E., Ladan S., Lyashko M., Shkurkin S.I., Facile biogenic synthesis and characterization of seven metal-based nanoparticles conjugated with phytochemical bioactives using *Fragaria ananassa* leaf extract, *Molecules*, 26 (2021), pp. 3025.
- Bednar N., Synthesis of metallic nanoparticles in electrolyte-plasma interface, Thesis, Faculty of Technical Sciences, University of Novi Sad, Serbia, (2014).



- Benamer S., Mahlous M., Boukrif A., Mansouri B., Youcef S.L., Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone), *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 248 (2006), 284 – 290.
- Benwood C., Chrenek J., Kirsch R.L., Masri N.Z., Richards H., Teetzen K., Willerth S.M., Natural Biomaterials and Their Use as Bioinks for Printing Tissues, *Bioengineering*, 8 (2021), pp. 27.
- Bertelli A., Biagi M., Corsini M., Bainsi G., Cappellucci G., Miraldi E., Polyphenols: From Theory to Practice, *Foods*, 10 (2021), pp. 2595.
- Beyene H.D., Werkneh A.A., Bezabh H.K., Ambaye T.G., Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review, *Sustainable Materials and Technologies*, 13 (2017), 18 – 23.
- Bharadwaj K.K., Rabha B., Pati S., Sarkar T., Choudhury B.K., Barman A., Bhattacharjya D., Srivastava A., Baishya D., Edinur H.A., Kari Z.A., Noor N.H.M., Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Plant Extracts as Beneficial Prospect for Cancer Theranostics, *Molecules*, 26 (2021), pp. 6389.
- Biao L., Tan S., Meng Q., Gao J., Zhang X., Liu Z., Fu Y., Green synthesis, characterization and application of proanthocyanidins-functionalized gold nanoparticles, *Nanomaterials*, 8(1) (2018), pp. 53.
- Bidaki M.Z., Aramjoo H., Mizwari Z.M., Mohammadparast-Tabas P., Javanshir R., Mortazavi-Derazkola S., Cytotoxicity, antifungal, antioxidant, antibacterial and photodegradation potential of silver nanoparticles mediated via *Medicago sativa* extract, *Arabian Journal of Chemistry*, 15 (2022), pp. 103842.
- Biesalski K. H., Obermueller-Jevic C.U., UV light, beta-carotene and human skin – beneficial and potentially harmful effects, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389 (1) (2001), 1 – 6.
- Binder L., Mazál J., Petz R., Klang V., Valenta C., The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels, *Skin Research and Technology*, 25(5) (2019), 725 – 734.
- Bindhu M.R., Umadevi M., Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles, *Materials Letters*, 120(1) (2014), 122 – 125.
- Blažić R., Marušić K., Vidović E., Swelling and Viscoelastic Properties of Cellulose-Based Hydrogels Prepared by Free Radical Polymerization of Dimethylaminoethyl Methacrylate in Cellulose Solution, *Gels*, 9 (2023), pp. 94.



- Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G., Wound healing dressings and drug delivery systems: A review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8) (2008), 2892 – 2923.
- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C., Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH[•] Free Radical Method, *LWT – Food Science and Technology*, 30(6) (1997), 609 – 615.
- Boomi P., Ganesan R.M., Poorani G., Prabu H.G., Ravikumar S., Jeyakanthan J., Biological synergy of greener gold nanoparticles by using *Coleus aromaticus* leaf extract, *Materials Science and Engineering: C*, 99 (2019), 202 – 210.
- Boomi P., Poorani G.P., Selvam S., Palanisamy S., Jegatheeswaran S., Anand K., Balakumar C., Premkumar K., Prabu, H.G., Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Croton sparsiflorus* leaves extract and evaluation of UV protection, antibacterial and anticancer applications, *Applied Organometallic Chemistry*, 34 (5) (2020), pp. 5574.
- Boral S., Gupta A.N., Bohidar H.B., Swelling and de-swelling kinetics of gelatin hydrogels in ethanol–water marginal solvent, *International Journal of Biological Macromolecules*, 39 (2006), 240 – 249.
- Boruah S.K., Boruah P.K., Sarma P., Medhi C., Medhi O.K., Green synthesis of gold nanoparticles using *Camellia sinensis* and kinetics of the reaction, *Advanced Materials Letters*, 3(6) (2012), 481 – 486.
- Bouqellah N.A., Mohamed M.M., Ibrahim Y., Synthesis of eco-friendly silver nanoparticles using *Allium* sp. and their antimicrobial potential on selected vaginal bacteria, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7) (2018), 1789 – 1794.
- Bragg W.L., 1913. The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal, *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 17 (1913), 43 – 57.
- Brumberg V., Astrelina T., Malivanova T., Samoilov A., Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings, *Biomedicines*, 9 (2021), pp. 1235.
- Buenger D., Topuz F., Groll J., Hydrogels in sensing applications, *Progress in Polymer Science*, 37 (2012), 1678 – 1719.
- Byrd A., Belkaid Y., Segre J., The human skin microbiome, *Nature Reviews Microbiology*, 16 (2018), 143 – 155.
- Cakić M., Glišić S., Cvetković D., Cvetinov M., Stanojević Lj., Danilović B., Cakić K., Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles produced from *Fumaria officinalis* L. plant extract, *Colloid Journal*, 80(6) (2018), 803 – 813.



- Cakić M., Glišić S., Nikolić G., Nikolić G.M., Cakić K., Cvetinov M.J., Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, (2016), 156 – 161.
- Cao J., Wu B., Yuan P., Liu Y., Hu C., Progress of Research on Conductive Hydrogels in Flexible Wearable Sensors, *Gels*, 10 (2024), pp. 144.
- Chand K., Cao D., Fouad D.E., Shah A.H., Dayo A.Q., Zhu K., Lakhan M.N., Mehdi G., Dong S., Green synthesis, characterization and photocatalytic application of silver nanoparticles synthesized by various plant extracts, *Arabian Journal of Chemistry*, 13 (2020), 8248 – 8261.
- Chang L., Ahmad B., Tong A., Wu Z., Xu P., Gao Z., Yin C., Luan M., Tong C., Liu B., Green synthesis of silver nanoparticles using Fructus Aurantii-loaded Citrus pectin hydrogel for accelerated healing of MRSA-infected diabetic wounds, *International Journal of Biological Macromolecules*, 315 (2025), pp. 144222.
- Chavan R.R., Bhinge S.D., Bhutkar M.A., Randive D.S., Wadkar G.H., Todkar S.S., Urade M.N., Characterization, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities and biological screening of green synthesized silver and iron nanoparticles using alcoholic *Blumea eriantha* DC plant extract, *Materials Today Communications*, 24 (2020), pp. 101320.
- Chen H., Kou X., Yang Z., Ni W., Wang J., Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles, *Langmuir*, 24(10) (2008), 5233 – 5237.
- Chen X.S., Zhang H.M., Yang X., Zhang W.H., Jiang M., Wen T., Wang J., Guo R., Liu H.J., Preparation and Application of Quaternized Chitosan- and AgNPs-Base Synergistic Antibacterial Hydrogel for Burn Wound Healing, *Molecules*, 26 (2021), pp. 4037.
- Chirani N., Yahia L.H., Gritsch L., Motta F.L., Chirani S., Faré S., History and Applications of Hydrogels, *Journal of Biomedical Science*, 4(2) (2015), 13 – 23.
- Chirumamilla P., Vankudoth S., Dharavath S.B., Dasari R., Taduri S., *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles and Leaf Methanolic Extract of *Solanum khasianum* Clarke, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 92 (2022), 301 – 307.
- Choudhary M.K., Kataria J., Sharma S., A biomimetic synthesis of stable gold nanoparticles derived from aqueous extract of *Foeniculum vulgare* seeds and evaluation of their catalytic activity, *Applied Nanoscience*, 7 (2017), 439 – 447.
- Choudhury D., Das A., Bhattacharya A., Chakrabarti G., Aqueous extract of ginger shows antiproliferative activity through disruption of microtubule network of cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010), 2872 – 2880.



- Ciuffi M., Pisanello M., Pagliai G., Raimondi L., Franchi-Micheli S., Cantore M., Mazzetti L., Failli P., Antioxidant protection in cultured corneal cells and whole corneas submitted to UV-B exposure, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 71 (2003), 59 – 68.
- Clearfield A., Introduction to Diffraction, Chapter 2, Principles and Applications of Powder Diffraction, *Wiley Online Library*, (2009), 73 – 122.
- Costea T., Lupu A.R., Vlase L., Nencu I., Gird C.E., Phenolic content and antioxidant activity of a raspberry leaf dry extract, *Romanian Biotechnological Letters*, 21(2) (2016), pp. 11345.
- Coulson M., Richardson J.F., Backhurst J.R., Harker J.H., Chemical engineering, Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, 2 (1991), 1 – 1183.
- Cracowski J.-L., Roustit M., Human Skin Microcirculation, *Comprehensive Physiology*, 10(3) (2020), 1105 – 1154.
- Cudalbeanu M., Peitinho D., Silva F., Marques R., Pinheiro T., Ferreira A.C., Marques F., Paulo A., Soeiro C.F., Sousa S.A., Leitão J.H., Tăbăcaru A., Avramescu S.M., Dinica R.M., Campello M.P.C., Sono-biosynthesis and characterization of AuNPs from Danube *Delta Nymphaea alba* root extracts and their biological properties, *Nanomaterials*, 11(6) (2021), pp. 1562.
- Cui Y., Zhao Y., Tian Y., Zhang W., Lü X., Jiang X., The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*, *Biomaterials*, 33(7) (2012), 2327 – 2333.
- Cvetković D.J., Stanojević Lj.P., Stanković M.Z., Cakić M.D., Savić S.R., Miljković M.D., Antioxidant activity of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves, *Separation Science and Technology*, 52 (2017), 1039 – 1051.
- Cvitanović A.B., Durgo K., Huđek A., Družina V.B., Komes D., Overview of polyphenols and their properties, Chapter 1, Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, (2018), 3 – 44.
- Ćorković I., Pichler A., Šimunović J., Kopjar M., Hydrogels: Characteristics and Application as Delivery Systems of Phenolic and Aroma Compounds, *Foods*, 10 (2021), pp. 1252.
- Dara P.K., Mahadevan R., Digita P.A., Visnuvinayagam S., Kumar L.R.G., Mathew S., Ravishankar C.N., Anandan R., Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): *In vitro* studies on antioxidant and antibacterial applications, *SN Applied Sciences*, 2 (2020), pp. 665.



- Davies J. M., Truscott J. W. R., Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63 (2001), 114 – 125.
- Dawadi S., Katuwal S., Gupta A., Lamichhane U., Thapa R., Jaisi S., Lamichhane G., Bhattarai D.P., Parajuli, N., Current research on silver nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications, review, *Journal of Nanomaterials*, 2021 (2021), 1 – 23.
- De Giglio E., Cafagna D., Cometa S., Allegretta A., Pedico A., Giannossa L.C., Sabbatini L., Mattioli-Belmonte M., Iatta R., An innovative, easily fabricated, silver nanoparticle-based titanium implant coating: development and analytical characterization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013), 805 – 816.
- De Gruijl R.F., van Kranen J.H., Mullenders H.F.L., UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63 (2001), 19 – 27.
- Deb P.K., Kokaz S.F., Abed S.N., Paradkar A., Tekade R.K., Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers, Chapter 6, Basic Fundamentals of Drug Delivery, *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*, (2019), 203 – 267.
- Dehghani F., Shirazi S.M., Shafiee M., Kasaei S.R., Amani A.M., Antiviral and antioxidant properties of green synthesized gold nanoparticles using *Glaucium flavum* leaf extract, *Applied Nanoscience*, 13(6) (2022), 4395 – 4405.
- Dejeu I.L., Vicaș L.G., Vlaia L.L., Jurca T., Mureșan, M.E., Pallag A., Coneac G.H., Olariu I.V., Muș A.M., Bodea A.S., Dejeu G.E., Maghiar O.A., Marian E., Study for Evaluation of Hydrogels after the Incorporation of Liposomes Embedded with Caffeic Acid, *Pharmaceuticals*, 15 (2022), pp. 175.
- Deng Z., Li M., Hu Y., He Y., Tao B., Yuan Z., Wang R., Chen M., Luo Z., Cai K., Injectable biomimetic hydrogels encapsulating Gold/metal-organic frameworks nanocomposites for enhanced antibacterial and wound healing activity under visible light actuation, *Chemical Engineering Journal*, 420 (2021), pp. 129668.
- Devadiga A., Shetty V.K., Saidutta M.B., Highly stable silver nanoparticles synthesized using *Terminalia catappa* leaves as antibacterial agent and colorimetric mercury sensor, *Materials Letters*, 207 (2017), 66 – 71.
- Diffey B.L., A method for broad spectrum classification of sunscreens, *International Journal of Cosmetic Science*, 16 (1994), 47 – 52.



- Diffey B.L., Tanner P.R., Matts P.J., Nash J. F., *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(6) (2000), 1024 – 1035
- Dinah K.H., Green synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of silver and zink oxide nanoparticles from extracts of *Bidens pilosa*, Thesis, University of Nairobi, (2019).
- Dipankar C., Murugan S., The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98 (2012), 112 – 119.
- Donga S., Bhadu G.R., Chanda S., Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of gold nanoparticles green synthesized using *Mangifera indica* seed aqueous extract, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 48(1) (2020), 1315 – 1325.
- Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012), 2740 – 2779.
- D’Urso G., Pizza C., Piacente S., Montoro P., Combination of LC-MS based metabolomics and antioxidant activity for evaluation of bioactive compounds in *Fragaria vesca* leaves from Italy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150 (2018), 233 – 240.
- Dueñas M., Mingo-Chornet H., Pérez-Alonso J.J., Di Paola-Naranjo R., González-Paramás A.M., Santos Buelga C., Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS, *European Food Research and Technology*, 227 (2008), 1069 – 1076.
- Dutra E.A., da Costa e Oliveira D.A.G., Kedor-Hackmann E.R.M., Santoro M.I.R.M., Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3) (2004), 381 – 385.
- Dutta P.P., Bordoloi M., Gogoi K., Roy S., Narzary B., Bhattachatyaa D.R., Mohapatra K., Mazumder B., Antimalarial silver and gold nanoparticles: Green synthesis, characterization and *in vitro* study, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91 (2017), 567 – 580.
- Dyul-Erosa M.S., Cauich-Díaz m.m., Razo-Lazcano T.A., Avila-Rodriguez m., Reyes-Aguilera J.A., González-Muñoz M.P., Aqueous leaf extracts of *Cnidioscolus chayamansa* (Mayan chaya) cultivated in Yucatán México. Part II: Uses for the phytomediated synthesis of silver nanoparticles, *Materials Science & Engineering C*, 91 (2018), 838 – 852.



- Ealias A.M., Saravankumar M.P., A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263 (2017), pp. 032019.
- Ebrahiminezhad A., Ghasemi Y., Rasoul-Amini S., Barar J., Davaran S., Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONs), *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33 (2012), pp. 3957.
- Ehrenhofer A., Binder S., Gerlach G., Wallmersperger T., Multisensitive Swelling of Hydrogels for Sensor and Actuator Design, *Advanced Engineering Materials*, (2020), pp. 2000004.
- Eker F., Akdaşçi E., DUMAN h., Bechelany M., Karav S., Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts: A Comprehensive Review of Physicochemical Properties and Multifunctional Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 26 (2025), pp. 6222.
- El-Aawar H., Increasing the transistor count by constructing a two-layer crystal square on a single chip, *International Journal of Computer Science, Information Technology, and Advanced Research*, 7 (2015), 97 – 105.
- Elahi N., Kamali M., Baghersad M.H., Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Talanta*, 184 (2018), 537 – 556.
- Elbagory A.M., Cupido C.N., Meyer M., Hussein A.A., Large scale screening of Southern African plant extracts for the green synthesis of gold nanoparticles using microtitre-plate method, *Molecules*, 21(11) (2016), pp. 1498.
- El-Borady O.M., Ayat M.S., Shabrawy M.A., Millet P., Green synthesis of gold nanoparticles using Parsley leaves extract and their applications as an alternative catalytic, antioxidant, anticancer, and antibacterial agents, *Advanced Powder Technology*, 31(10) (2020), 4390 – 4400.
- El-Borady O.M., Fawzy M., Hosny M., Antioxidant, anticancer and enhanced photocatalytic potentials of gold nanoparticles biosynthesized by common reed leaf extract, *Applied Nanoscience*, 13(5) (2021), 3149 – 3160.
- El-Seedi H.R.; Omara M.S.; Omar A.H.; Elakshar M.M.; Shoukhba Y.M.; Duman H.; Karav S.; Rashwan A.K.; El-Seedi A.H.; Altaieb H.A.; Gao H., Saeed A., Jefri O.A., Guo Z., Khalifa S.A.M., Updated Review of Metal Nanoparticles Fabricated by Green Chemistry Using Natural Extracts: Biosynthesis, Mechanisms, and Applications, *Bioengineering*, 11 (2024), pp. 1095.



- El-Sherbiny I.M., Yacoub M.H., Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges, *Global Cardiology Science & Practice*, 2013 (2013), pp. 38.
- Epp J., X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization, Chapter 4, *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, (2016), 81 – 124.
- Ermawati D.E.E., Novachiria S.R., Ramadhan B.R., Hadi S., The effect of turmeric juice volume on the characteristics and antibacterial activity of nanosilver biosynthetic and hydrogel formulation, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32 (2) (2022), 234 – 243.
- Espenti C.S., Rao K.S.V.K., Rao K.M., Bio-synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* leaf extract and evaluation of its antimicrobial potential, *Material Letters*, 174 (2016), 129 – 133.
- Fafal T., Taştan P., Tüzüna B.S., Ozyazici M., Kivcak B., Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Asphodelus aestivus* Brot. aerial part extract, *South African Journal of Botany*, 112 (2017), 346 – 353.
- Fahim M., Shahzaib A., Nishat N., Jahan A., Bhat T.A., Inam A., Green synthesis of silver nanoparticles: A comprehensive review of methods, influencing factors, and applications, *Journal of Colloid and Interface Science*, 16 (2024), pp. 100125.
- Fan Y., Han Q., Li H., Cai X., Dyett B., Qiao R., Drummond C.J., Thang H., Zhai J., Recent Developments in Nanoparticle-Hydrogel Hybrid Materials for Controlled Release, *Advanced Science*, (Weinh), 12(35) (2025), pp. 07209.
- Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R., Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine*, 6(1) (2010), 103 – 109.
- Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4) (2000), 662 – 668.
- Ferlemi A.V., Lamari F.N., Berry Leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value, *Antioxidants*, 5 (2016), pp. 17.
- Ferrag C., Li S.P., Jeon K., Andoy N.M., Sullan R.M.A., Mikhaylichenko S., Kerman K., Polyacrylamide hydrogels doped with different shapes of silver nanoparticles: Antibacterial and mechanical properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197 (2021), pp. 111397.
- Foti M.C., Use and Abuse of the DPPH[•] Radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2015), 8765 – 8776.



- Fraga C.G., Croft K.D., Kennedy D.O., Tomás-Barberán F.A., The effects of polyphenols and other bioactives on human health, *Food & Function*, 10 (2019), pp. 514.
- Francis S., Koshy E., Mathew B., Green synthesis of *Stereospermum suaveolens* capped silver and gold nanoparticles and assessment of their innate antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(7) (2018), 939 – 951.
- Gabriela A.-M., Gabriela M. de O.-V., Luis A.-M., Reinaldo P.-R., Michael H.-M., Rodolfo G.-P., Roberto V.-B.J., Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Mint Leaf Extract (*Mentha piperita*) and Their Antibacterial Activity, *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 9 (2017), 1 – 10.
- Gao K., Xu K., Advancements and Prospects of pH-Responsive Hydrogels in Biomedicine, *Gels*, 11 (2025), pp. 293.
- Garcia M.A., Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics, IOP Publishing*, 44(28) (2011), pp. 283001.
- Gaspar L.R., Campos P.M.B.G.M., Rheological behavior and the SPF of sunscreens, *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1) (2003), 35 – 44.
- Gasparro F. P., Mitchnick M., Nash J.F., A review of sunscreen safety and efficacy, *Photochemistry and Photobiology*, Oxford, 68 (1998), 243 – 256.
- Gebecki J.M., Du J., Collins J., Tweeddale H., Peroxidation of proteins and lipids in suspensions of liposomes, in blood serum, and in mouse myeloma cells, *Acta Biochimica Polonica*, 47(4) (2000), 901 – 911.
- Geetha, R., Ashokkumar, T., Tamilselvan, S., Govindaraju K., Sadiq M., Singaravelu G., Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. *Cancer Nano*, 4 (2013), 91 – 98.
- Geng Y., Liu X., Yu Y., Li W., Mou Y., Chen F., Hu X., Ji J., Ma L., From polyphenol to o-quinone: Occurrence, significance, and intervention strategies in foods and health implications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(4) (2023), 3254 – 3291.
- Ghasemi S., Dabirian S., Kariminejad F., Eghbali Koohi D., Nemattalab M., Majidimoghadam S., Zamani E., Yousefbeyk F., Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles using *Rubus discolor* leaves extract and its biological activities against multi-drug resistant bacteria and cancer cells, *Scientific Reports*, 14(1) (2024), pp. 4130.



- Ghazwani M., Hani U., Alqarni M.H., Alam A., Development and Characterization of Methyl-Anthranilate-Loaded Silver Nanoparticles: A Phytocosmetic Sunscreen Gel for UV Protection, *Pharmaceutics*, 15 (2023), pp. 1434.
- Glišić S., Cakić M., Nikolić G., Danilović B., Synthesis, characterization and antimicrobial activity of carboxymethyl dextrane stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1084 (2015), 345 – 351.
- Glišić S.Lj., Razvoj biokompleksa i nanočestica bioaktivnih metala stabilizovanih oligosaharidima, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac, (2017).
- Goon I.Y., Lai L.M.H., Muntroe P., Gooding J.J., Amal R., Fabrication and dispersion of Au shell-protected magnetite nanoparticles: systematic control using polyethyleneimine, *Chemistry of Materials*, 21(4) (2009), 673 – 681.
- González S., Fernández-Lorente M., Gilaberte-Calzada Y., The latest on skin photoprotection, *Clinics in Dermatology*, 26(6) (2008), 614 – 626.
- Gopinath K., Kumaraguru S., Bhakayaraj K., Mohan S., Venkatesh K.S., Esakkirajan M., Kaleeswarran P.R., Naiyf S.A., Kadaikunnan S., Govindarajan M., Benelli G., Arumugam A., Green synthesis of silver, gold and silver/gold bimetallic nanoparticles using the *Gloriosa superba* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activities, *Microbial Pathogenesis*, 101 (2016), 1 – 11.
- Gulrez S.K.H., Al-Assaf S., Phillips G.O., Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Chapter 5, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications, Ed. Carpi A., (2011), 117 – 151.
- Gutierrez E., Villaraco A.G., Lucas J.A., Gradullas A., Mañero F.J.G., Solano B.R., Transcriptomics, targeted metabolomics and gene expression of blackberry leaves and fruits indicate flavonoid metabolic flux from leaf to red fruit, *Frontiers in Plant Science*, 8 (2017), 1 – 15.
- Gutierrez F.M., Thi E.P., Silverman J.M., Oliveira D., Camargo C., Svensson S.L., Hoek A.V., Sánchez E.M., Reiner N.E., Gaynor E.C., Pryzdial E.L., Conway E.M., Orrantia E., Ruiz F., Av-Gay Y., Bach H., Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine*, 8 (2012), 328 – 336.
- Gutiérrez-Mañero F.J., García-Villaraco A., Lucas J.A., Gutiérrez E., Ramos-Solano B., Inoculant/Elicitation Technology to Improve Bioactive/Phytoalexin Contents in



- Functional Foods, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(6) (2015), 224 – 241.
- Habibullah G., Viktorova J., Ulbrich P., Ruml T., Effect of the physicochemical changes in the antimicrobial durability of green synthesized silver nanoparticles during their long-term storage, *RSC Advances*, 12 (2022), 30386 – 30403.
- Hajizadeh Z., Taheri-Ledari R., Asl F.R., Identification and analytical methods, Chapter 3, Heterogeneous Micro and Nanoscale Composites for the Catalysis of Organic Reactions, *Micro and Nano Technologies*, (2022), 33 – 51.
- Halliday G.M., Bestak R., Yuen K.S., Cavanagh L.L., Barnetson R.St.C., UVA-induced immunosuppression, *Mutation Research*, 422 (1998), 139 – 145.
- Hamelian M., Hemmati S., Varmira K., Veisi H., Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using *Pistacia Atlantica* extract, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 93 (2018), 21 – 30.
- Hanafiah R.M., Ghafar S.A.A., Lim V., Musa S.N.A., Yakop F., Anuar A.H.H., Green synthesis, characterisation and antibacterial activities of *Strobilanthes crispus*-mediated silver nanoparticles (SC-AGNPS) against selected bacteria, *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, 51(1) (2023), 549 – 559.
- Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D., Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, *International Centre for Science and High Technology*, (2008), 1 – 266.
- Harish V., Ansari M.M., Tewari D., Gaur M., Yadav A.B., García-Betancourt M.-L., Abdel-Haleem F.M., Bechelany M., Barhoum A., Nanoparticle and Nanostructure Synthesis and Controlled Growth Methods, *Nanomaterials*, 12 (2022), pp. 3226.
- Harun-Ur-Rashid M., Foyez T., Krishna S.B.N., Poda S., Imran A.B., Recent advances of silver nanoparticle-based polymer nanocomposites for biomedical applications, *RSC Advances*, 15 (2025), 8480 – 8505.
- Hassan M.U., Chattha M.U., Khan I., Chattha M.B., Aamer M., Nawaz M., Ali A., Khan M.A.U., Khan T.A., Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities – a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (2019), 12673 – 12688.
- Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Press, Geneva, (2017).



- Heidari Z., Salehzadeh A., Shandiz S.A.S., Tajdoost S., Anticancer and antioxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles, *3 Biotechnology*, 8 (2018), pp. 177.
- Hennink W.E., van Nostrum C.F., Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012), 223 – 236.
- Hepokur C., Kariper İ.A., Mısır S., Ay E., Tunoğlu S., Ersez M.S., Zeybek U., Kuruca S.E., Yaylım İ., Silver nanoparticle/capecitabine for breast cancer cell treatment, *Toxicology In Vitro*, 61 (2019), 104600.
- Ho T.-C., Chang C.-C., Chan H.-P., Chung T.-W., Shu C.-W., Chuang K.-P., Duh T.-H., Yang M.-H., Tyan Y.-C., Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine, *Molecules*, 27 (2022), pp. 2902.
- Hosny M., Fawzy M., Abdelfatah A.M., Fazwy E.E., Eltaweil A.S., Comparative study on the potentialities of two halophytic species in the green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer, antioxidant and catalytic efficiencies, *Advanced Powder Technology*, 32(9) (2021), 3220 – 3233.
- Hossain N., Islam M.A., Chowshury M.A., Synthesis and characterization of plant extracted silver nanoparticles and advances in dental implant applications, *Heliyon*, 8 (2022), pp. 12313.
- Huang C., Dong L., Zhao B., Lu Y., Huang S., Yuan Z., Luo G., Xu Y., Qian W., Anti-inflammatory hydrogel dressings and skin wound healing, *Clinical and Translational Medicine*, 12(11) (2022), pp. 1094.
- Huang J., Li Q., Sun D., Su Y., Yang X., Wang H., Wang Y., Shao W., He N., Hong J., Chen C., Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf, *Nanotechnology*, 18 (2007), 1 – 12.
- Huang X., Devi S., Bordiga M., Brennan C.S., Xu B., Phenolic compounds mediated biosynthesis of gold nanoparticles and evaluation of their bioactivities: A review, *International Journal of Food Science and Technology*, 58(4) (2023), 1673 – 1694.
- Huq M.A., Ashrafudoulla M., Rahman M.M., Balusamy S.R., Akter S., Green Synthesis and Potential Antibacterial Applications of Bioactive Silver Nanoparticles: A Review, *Polymers*, 14 (2022), pp. 742.
- Hwang S.J., Jun S.H., Park Y., Song-Hyun C., Yoon M., Cho S., Hyo-Jong L., Park Y., Green synthesis of gold nanoparticles using chlorogenic acid and their enhanced performance for inflammation, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(7) (2015), 1677 – 1688.



- Iacopini P., Baldi M., Storch P., Sebastiani L., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8) (2008), 589 – 598.
- Ichihashi M., Ueda M., Budiyannto A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T., UV induced skin damage, *Toxicology*, 189 (2003), 21 – 39.
- Iftime M.M., Ailiesei G.L., Ailincăi D., Tuning Antioxidant Function through Dynamic Design of Chitosan-Based Hydrogels, *Gels*, 10(10) (2024), pp. 655.
- Ilić-Stojanović S., Nikolić Lj., Nikolić V., Ristić I., Cakić S., Petrović S., Temperature-Sensitive Hydrogels as Carriers for Modulated Delivery of Acetaminophen, *Gels*, 9 (2023), pp. 684.
- İpek P., Baran M.F., Baran A., hatipoğlu A., Keskin C., Yıldıztekin M., Küçükaydin S., Becerekli H., Kurt K., Eftekhari A., Huseynova I., Khalilov R., Cho W.C., Green synthesis and evaluation of antipathogenic, antioxidant, and anticholinesterase activities of gold nanoparticles (AuNPs) from *Allium cepa* L. peel aqueous extract, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14 (2023), 10661 – 10670.
- Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants, *Green Chemistry*, 13 (2011), 2638 – 2650.
- Irmukhametova G.S., Mun G.A., Khutoryanskiy V.V., Hydrogel Dressings, Chapter 9, Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications, Ed. Boateng J., (2020), 185 – 207.
- Ishiyama M., Tominaga H., Shiga M., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K., A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and cristal violet, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(11) (1996), 1518 – 1520.
- Islam M.T., Rodríguez-Hornedo N., Ciotti S., Ackermann C., Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph, *Pharmaceutical Research*, 21(2004), 1192 – 1199.
- Ivanov I.G., Vracheva V.Z., Marchev A.S., Petkova N.T., Aneva I.Y., Danev P.P., Georgiev V.G., Antioxidant activites and phenolic compounds in *Bulgarien Fumaria* species, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2) (2014), 296 – 306.
- Jacob S.J.P., Finub J.S., Narayanan A., Synthesis of silver nanoparticles using *Piper longum* leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91 (2012), 212 – 214.



- Jemilugba O.T., Sakho El H.M., Parani S., Mavumengwana V., Oluwafemi O.S., Green synthesis of silver nanoparticles using *Combretum erythrophyllum* leaves and its antibacterial activities, *Colloid and Interface Science Communications*, 31(2019), pp. 100191.
- Jiang Y., Krishnan N., Heo J., Fang R.H., Zhang L., Nanoparticle–hydrogel superstructures for biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 324 (2020), 505 – 521.
- Jiang Y.G., Huang J.J., Wu X.W., Ren Y.H., Li Z.A., Ren J.A., Controlled release of silver ions from AgNPs using a hydrogel based on konjac glucomannan and chitosan for infected wounds, *International Journal of Biological Macromolecules*, 149 (2020), 148 – 157.
- Jogaiah S., Kurjogi M., Abdelrahman M., Hanumanthappa N., Tran L.S.P., *Ganoderma applanatum* mediated green synthesis of silver nanoparticles: Structural characterization, and *in vitro* and *in vivo* biomedical and agrochemical properties, *Arabian Journal of Chemistry*, (2018), 1 – 13.
- Joseph S., Mathew B., Microwave assisted facile green synthesis of silver and gold nanocatalysts using the leaf extract of *Aerva lanata*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136 (2015), 1371 – 1379.
- Joudeh N., Linke D., Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists, *Journal of Nanobiotechnology*, 20 (2022), pp. 262.
- Kaiser W., Kuerz P., EUVL – extreme ultraviolet lithography, *Optik & Photonik*, 3 (2008), 35 – 39.
- Kajani A.A., Bordbar A.K., Esfahani S.H.Z., Razmjou A., Gold nanoparticles as potent anticancer agent: Green synthesis, characterization, and *in vitro* study, *RSC Advances*, 6(68) (2016), 1 – 12.
- Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E., Guidelines for cell viability assays, *Food Frontiers*, 1 (2020), 332 – 349.
- Kamoun E.A., Kenawy El-R.S., Chen X., A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, *Journal of Advanced Research*, 8(3) (2017), 217 – 233.
- Kapuścińska A., Nowak I., Silver nanoparticles as a challenge for modern cosmetology and pharmacology, Chapter 15, *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*, 10 (2016), 395 – 417.



- Kårlund A., Hanhineva K., Lehtonen M., McDougall G.J., Stewart D., Karjalainen R.O., Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7) (2017), 2182 – 2190.
- Karmakar S., Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering: Techniques to Characterize Stability and Surface Charge Distribution of Charged Colloids, *Recent Trends in Materials Physics and Chemistry*, (2019) 117 – 159.
- Karoyo A.H., Wilson L.D., A Review on the Design and Hydration Properties of Natural Polymer-Based Hydrogels, *Materials*, 14 (2021), pp. 1095.
- Kathiravan V., Ravi S., Ashokkumar S., Velmurugan S., Elumalai K., Khatiwada C.P., Green synthesis of silver nanoparticles using *croton sparsiflorus morong* leaf extract and their antibacterial and antifungal activities, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2014), 1 – 24.
- Keat C.L., Aziz A., Eid A.M., Elmarzugi, Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles, *Bioresources and Bioprocessing*, 2(47) (2015), 1 – 11.
- Kestell A.E., DeLorey G.T., Nanoparticles : properties, classification, characterization, and fabrication, Ed. 1, Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y., (2010).
- Khan A.K., Rashid R., Murtaza G., Zahra A., Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (7) (2014), 1169 – 1177.
- Khan M., Al-Marri A.H., Khan M., Mohri N., Adil S.F., Al-Warthan A., Siddiqui M.R.H., Alkhathlan H.Z., Berger R., Tremel W., Tahir M.N., *Pulicaria glutinosa* plant extract: a green and eco-friendly reducing agent for the preparation of highly reduced graphene oxide, *RSC Advances*, 4 (2014), 24119 – 24125.
- Khan M.Z.H., Tareq F.K., Hossen M.A., Roki M.N.A.M., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract, *Journal of Engineering Science and Technology*, 13(1) (2018), 158 – 166.
- Khan S.A., Salman S., Al-Ghamdi Y.O., Nanotherapeutic Strategies and New Pharmaceuticals (Part 1); Bentham Sciences Book: Al Sharjah, United Arab Emirates, (2021), 1 – 228.
- Khan S.A., Shahid S., Lee C.S., Green synthesis of gold and silver nanoparticles using leaf extract of *Clerodendrum inerme*; Characterization, antimicrobial, and antioxidant activities, *Biomolecules*, 10(6) (2020), pp. 835.



- Kim H.S., Seo Y.S., Kim K., Han J.W., Park Y., Cho S., Concentration effect of reducing agents on green synthesis of gold nanoparticles: Size, morphology, and growth mechanism, *Nanoscale Research Letters*, 11(2016), 1 – 9.
- Kim M.S., Jin J.S., Kwak Y.S., Hwang G.S., Metabolic Response of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Leaves Exposed to the Angular Leaf Spot Bacterium (*Xanthomonas fragariae*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(9) (2016), 1 – 37.
- Kim N., Shin Y.J., Park S., Yoo G., Kim Y.J., Yoo H.H., Kim S.H., Simultaneous determination of six compounds in *Hedera helix* L. using UPLC-ESI-MS/MS, *Chromatographia*, 80 (2017), 1025 – 1033.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S.Y., McLaughlin M.J., Lead J.R., Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9) (2008), 1825 – 1851.
- Kolekar Y., Tamboli F., Gaikwad D., Memon S., Gulavani S., Alaskar K., Mali D., Pawar V., Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Annona squamosa* L. Seed and Leaves Extract: Evaluation of the Anti-inflammatory, Antifungal, and Antibacterial Potency, *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 14(2) (2023), 377 – 387.
- Kolman M., Smith C., Chakrabarty D., Amin S., Rheological stability of carbomer in hydroalcoholic gels: Influence of alcohol type, *International Journal of Cosmetic Science*, 43(6) (2021), 748 – 763.
- Koperuncholan M., Bioreduction of chloroauric acid (HAuCl_4) for the synthesis of gold nanoparticles (GNPs): A special empathy of pharmacological activity, *International Journal of Phytopharmacology*, 5(4) (2015), 72 – 80.
- Kora A.J., Rastogi L., Green synthesis of palladium nanoparticles using gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its application as an antioxidant and catalyst, *Arabian Journal of Chemistry*, 11(7) (2018), 109 – 1106.
- Kotula M., Kapusta-Duch J., Smoleń S., Doskočil I., Phytochemical Composition of the Fruits and Leaves of Raspberries (*Rubus idaeus* L.) - Conventional vs. Organic and Those Wild Grown, *Applied Science*, 12 (2022), pp. 11783.
- Kougkolos G., Golzio M., Laudebat L., Valdez-Nava Z., Flahaut E., Hydrogels with electrically conductive nanomaterials for biomedical applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 11 (2023), 2036 – 2062.



- Kouvaris P., Delimitis A., Zaspalis V., Papadopoulos D., Tsipas S.A., Michailidis N., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract, *Materials Letters*, 76 (2012), 18 – 20.
- Kshtriya V., Koshti B., Gour N., Green synthesized nanoparticles: Classification, synthesis, characterization, and applications, Chapter 4, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 94 (2021), 173 – 222.
- Kumar A., Dixit C.K., Methods for characterization of nanoparticles, 3 Chapter, *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, (2017), 43 – 58.
- Kumar D.A., Palanichamy V., Roopan S.M., Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 127 (2014), 168 – 171.
- Kumar M., Ranjan R., Dandapat S., Srivastava R., Sinha M.P., XRD Analysis for Characterization of Green Nanoparticles: A Mini Review, *Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1) (2022), pp. 555779.
- Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D., Analysis of Cell Viability by the MTT Assay, *Cold Spring Harbor Protocol*, 2018(6) (2018), 469 – 472.
- Kumar V., Yadav S.C., Yadav S.K., *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (2010), 1 – 9.
- Kumar V., Yadov S.K., Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84 (2009), 151 – 157.
- Kumari, P. and Meena, A., Green synthesis of gold nanoparticles from *Lawsonia Inermis* and its catalytic activities following the Langmuir–Hinshelwood mechanism, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 606(5) (2020), pp. 125447.
- Lavrentev F.V., Shilovskikh V.V., Alabusheva V.S., Yurova V.Y., Nikitina A.A., Ulasevich S.A., Skorb E.V., Diffusion-Limited Processes in Hydrogels with Chosen Applications from Drug Delivery to Electronic Components, *Molecules*, 28 (2023), pp. 5931.
- Lee C.-J., Wu H., Hu Y., Young M., Wang H., Lunch D., Xu F., Cong H., Cheng G., Ionic conductivity of polyelectrolyte hydrogels, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(6) (2018), 5845 – 5852.
- Lee K.X., Shameli K. Miyake Kuwano N., Khairudin N.B.B.A., Mohamad S.E.B., Yew Y.P., Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Garcinia mangostana* fruit peels, *Journal of Nanomaterials*, 2016(1) (2016), pp. 8489094.



- Lee K.X., Shameli K., Yew Y.P., Teow S.Y., Jahangirian H., Rafiee Moghaddam, Webster T.J., Recent Developments in the Facile Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles (AuNPs) and Their Biomedical Applications, *International Journal of Nanomedicine*, 15 (2020), 275 – 300.
- Lee P.I., Kinetics of drug release from hydrogel matrices, *Journal of Controlled Release*, 2 (1985), 277 – 288.
- Lee Y.J., Ahn E.Y., Park Y., Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract, *Nanoscale Research Letters*, 14(1) (2019), pp. 129.
- Leyu A.M., Debebe S.E., Bachheti A., Rawat Y.S., Bachheti R.K., Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Invasive Alien Plant *Parthenium hysterophorus* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities, *Sustainability*, 15 (2023), pp. 9456.
- Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Duan S.S., Ouyang Y.S., Chen Y.B., Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *BioMetals*, 24(1) (2011), 135 – 141.
- Li Z.H., Guo H., Xu W.B., Ge J., Li X., Alimu M., He D.J., Rapid identification of flavonoid constituents directly from PTP1B inhibitive extract of raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS, *Journal of Chromatographic Science*, 54(5) (2016), 805 – 810.
- Liaqat N., Jahan N., Rahman K.-ur, Anwar T., Qureshi H., Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay, *Frontiers in Chemistry*, 10 (2022), 1 – 13.
- Lin H., Yin C., Mo A., Hong G., Applications of Hydrogel with Special Physical Properties in Bone and Cartilage Regeneration, *Materials*, 14 (2021), pp. 235.
- Liu L., Ma W., Wang J., Wang X., Li S., Recent Progress in Polyphenol-Based Hydrogels for Wound Treatment and Monitoring, *Biosensors*, 15 (2025), pp. 657.
- Liu Y., Wang J., Sun Z., Aromatic Biobased Polymeric Materials Using Plant Polyphenols as Sustainable Alternative Raw Materials: A Review, *Polymers*, 16 (2024), pp. 2752.
- Logeswari P., Silambarasan S., Abrraham J., Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property, *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(3) (2015), 311 – 317.
- Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H., Tam P.K.H., Chiu J.F., Che C.M., Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12 (2007), 527 – 534.



- Loo Y.Y., Rukayadi Y., Nor-Khaizura M.A.R., Kuan C.H., Chieng B.W., Nishibuchi M., Rad S., *In vitro* antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens, *Frontiers in Microbiology*, 9(16) (2018), 1 – 7.
- Lowry G.V., Hill R.J., Harper S., Rawle A.F., Hendren C.O., Klaessig F., Nobbmann U., Sayre P., Rumble J., Guidance to improve the scientific value of zeta potential measurements in nanoEHS, *Environmental Science: Nano*, 3 (2016), pp. 953.
- Lu B., Ye H., Shang S., Xiong Q., Yu K., Li Q., Xiao Y., Dai F., Lan G., Novel wound dressing with chitosan gold nanoparticles capped with a small molecule for effective treatment of multiantibiotic-resistant bacterial infections, *Nanotechnology*, 29 (2018), pp. 425603.
- Luo T., Chen S., Zhang H., Jia S., Wang J., Phytochemical composition and potential biological activities assessment of raspberry leaf extracts from nine different raspberry species and raspberry leaf tea, *Journal of Berry Research*, 10(2) (2020), 295 – 309.
- Madou M.J., Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology - Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology, 3rd Edition, *Taylor & Francis Group*, 11 (2011), pp. 1992.
- Majcher M.J., Hoare T., Hydrogel Properties and Characterization Techniques, Chapter 13, Functional Biopolymers, Springer Nature, Cham, Switzerland AG, (2019), 429 – 452.
- Mallikarjuna K., Narasimhab G., Dillipa G.R., Praveenb B., Shreedharc B., Lakshmic S.C., Reddyc B.V.S., Raju B D.P., Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum* leaf extract and their characterization, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1) (2011), 181 – 186.
- Malone N., Strawberries: Cultivation, antioxidant properties and health benefits, Nova Science Publishers, (2014), 1 – 20.
- Mamdooh N.W., Naeem G.A., The effect of temperature on green synthesis of silver nanoparticles, *AIP Conference Proceedings*, 2450 (2022), pp. 020045.
- Manikandan R., Beulaja M., Thiagarajan R., Palanisamy S., Goutham G., Koodalingam A., Prabhu N.M., Kannapiran E., Jothi Basu M., Arulvasu C., Arumugam M., Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Phyllanthus acidus* L. fruits and characterization of its anti-inflammatory effect against H₂O₂exposed rat peritoneal macrophages, *Process Biochemistry*, 55 (2017), 172 – 181.



- Mansur J.S., Breder M.N.R., Mansur M.C.A., Azulay R.D., Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, 61 (1986), 121 – 124.
- Marković Z., Đorović J., Petrović Z.D., Petrović V.P., Simijonović D., Investigation of the antioxidant and radical scavenging activities of some phenolic Schiff bases with different free radicals, *Journal of Molecular Modeling*, 21 (2015), pp. 293.
- Marković Z., Study of the mechanisms of antioxidative action of different antioxidants, *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics*, 10(1) (2016), 135 – 150.
- Marslin G., Selvakesavan R.K., Franklin G., Sarmento B., Dias A.C.P., Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*, *International Journal of Nanomedicine*, (2015), 5955 – 5963.
- Marslin G., Siram K., Maqbool Q., Selvakesavan R.K., Kruszka D., Kachlicki P., Franklin G., Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles, *Materials*, 11 (2018), pp. 940.
- Maslov O., Komisarenko M., Ponomarenko S., Horopashna D., Osolodchenko T., Kolisnyk S., Derymedvid L., Shovkova Z., Akhmedov E., Investigation the influence of biologically active compounds on the antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaf extract, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 35(4) (2022), 229 – 235.
- Mathur P., Jha S., Ramteke S., Jain N.K., Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles, *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, 46 (2017), 115 – 126.
- McKnight G., Shah J., Hargest R., Physiology of the skin, *Surgery (Oxford)*, 40 (1) (2021), 8 – 12.
- Medici S., Peana M., Pelucelli A., Zoroddu M.A., An updated overview on metal nanoparticles toxicity, *Seminars in Cancer Biology*, 76 (2021), 17 – 26.
- Mehta B.K., Chhajlani M., Shrivastava B.D., Green synthesis of silver nanoparticles and their characterization by XRD, *Journal of Physics: Conf. Series*, 836 (2017), pp. 012050.
- Mekuye B., Abera B., Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications, *Nano Select*, 4 (2023), 486 – 501.
- Memete A.R., Sărac I., Teusdea A.C., Budău R., Bei M., Vicas S.I., Bioactive compounds and antioxidant capacity of several blackberry (*Rubus spp.*) fruits cultivars grown in Romania, *Horticulturae*, 9 (2023), pp. 556.
- Michalska A., Carlen C., Heritier J., Andlauer W., Profiles of bioactive compounds in fruits and leaves of strawberry cultivars, *Journal of Berry Research*, 7 (2017), 71 – 84.



- Mikhailova E.O., Gold Nanoparticles: Biosynthesis and Potential of Biomedical Application, *Journal of Functional Biomaterials*, 12 (2021), pp. 70.
- Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K., Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, *Food Chemistry*, 130 (2012), 1036-1043.
- Mitić M., Tošić S., Pavlović A., Mašković P., Kostić D., Mitić J., Stevanović V., Optimization of the extraction process of minerals from *Salvia officinalis* L. using factorial design methodology, *Microchemical Journal*, 145 (2019), 1224 – 1230.
- Mittal A.K., Christi Y., Banerjee U.C., Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances*, 31(2) (2013), 346 – 356.
- Mohamed M.A., Jaafar J., Ismail A.F., Othman M.H.D., Rahman M.A., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, Chapter 1, Membrane Characterization, (2017), 3 – 29.
- Mohania D., Chandel S., Kumar P., Verma V., Digvijay K., Tripathi D., Choudhury K., Sandeep K.M., Shah D., Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. In: Ahmad, S. (eds) Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment. Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, Cham., 996 (2017), 71 – 87.
- Moosavy M.H., de la Guardia M., Mokhtarzadeh A., Khatibi S.A., Hosseinzadeh N., Hji pour N., Green synthesis, characterization, and biological evaluation of gold and silver nanoparticles using *Mentha spicata* essential oil, *Scientific Reports*, 13 (2023), pp. 7230.
- Morais J.M., Papadimitrakopoulos F., Burgess D.J., Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(2) (2010), 188 – 196.
- Morgan A.J., X-ray microanalysis in electron microscopy for biologists, Oxford University Press, (1985).
- MubarakAli D., Thajuddin N., Jeganathan K., Gunasekaran M., Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85.2 (2011), 360 – 365.
- Muthuvel A., Adavallan K., Balamurugan K., Krishnakumar N., Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(2) (2014), 325 – 332.
- Nabikhan A., Kandasamy K., Raj A., Alikunhi N.M., Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2) (2010), 488 – 493.



- Nadaroğlu H., Güngör A.A., İnce S., Synthesis of nanoparticles by green synthesis method, *International Journal of Innovative Research and Reviews*, 1(1) (2017), 6 – 9.
- Naficy S., Razal J.M., Spinks G.M., Wallace G.G., Whitten P.G., Electrically conductive, tough hydrogels with pH sensitivity, *Chemistry of Materials*, 24 (2012), 3425 – 3433.
- Nagajyothi P.C., Lee K.D., Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Dioscorea batatas* rhizome extract and evaluation of their antimicrobial activities, *Journal of Nanomaterials*, (2011), 1 – 7.
- Naghizadeh A., Mizwari Z.M., Ghoreishi S.M., Lashgari S., Mortazavi-Derazkola S., Rezaie B., Biogenic and eco benign synthesis of silver nanoparticles using jujube core extract and its performance in catalytic and pharmaceutical applications: Removal of industrial contaminants and *in-vitro* antibacterial and anticancer activities, *Environmental Technology & Innovation*, 23 (2021), pp. 101560.
- Naraginti S., Li Y., Preliminary investigation of catalytic, antioxidant, anticancer and bactericidal activity of green synthesized silver and gold nanoparticles using *Actinidia deliciosa*, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 170 (2017), 225 – 234.
- Ndhlala A.R., Moyo M., Staden J.V., Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules, *Molecules*, 15(10) (2010), 6905 – 6930.
- Nenadis N., Tsimidou M.Z., DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1 picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colorimetric assay(s), Chapter 8, *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*, (2017), 141 – 164.
- Netala V.R., Bethu M.S., Pushpalatha B., Baki V.B., Aishwarya S., Rao J.V., Tarte V., Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities, *International Journal of Nanomedicine*, 11 (2016), 5683 – 5696.
- Ngigi A.N., Muaraguri B.M., ICP-OES determination of essential and non-essential elements in *Moringa oleifera*, *Salvia hispanica* and *Linum usitatissimum*, *Scientific African*, 6 (2019), pp. 00165.
- Nikolić G., Cakić M., Glišić S., Cvetković D., Mitić Ž., Marković D., In Fourier Transforms. High-tech Application and Current Trends, G. Nikolić, M. Cakić, D. Cvetković, Eds., InTech, Rijeka, Croatia, (2016), pp. 149.
- Nithin B.R., Bhuyar P., Environment Friendly Approach for Plant Mediated Green Biosynthesis of Gold Nanoparticles and Their Modern Applications in Biomedical Aspects – an Updated Report, *Bio Nano Science*, 13 (2023), 1517 – 1540.



- Noratto G., Chew B.P., Ivanov I., Red raspberry decreases heart biomarkers of cardiac remodeling associated with oxidative and inflammatory stress in obese diabetic db/db mice, *Food & Function*, 7 (2016), pp. 4944.
- Norval M., Effects of solar radiation on the human immune system, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63 (2001), 28 – 40.
- Noyan I.C., Cohen J.B., Residual stress, measurement by diffraction and interpretation, 1. Ed., Springer Verlag, (1987).
- Oldoni T.L.C., Meriln N., Karling M., Carpes S.T., Matias de Alencar S., Morales R.G.F., Aparecido da Silva E., Pilau E.J., Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil, *Food Research International*, 125 (2019), pp. 108647.
- Oliveira E., C. Núñez, H.M. Santos, J. Fernández Lodeiro, A. Fernández-Lodeiro, J.L. Capelo, C. Lodeiro, Revisiting the use of Gold and Silver Functionalised Nanoparticles as Colorimetric and Fluorometric Chemosensors for metal ions, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 212 (2015), 297 – 328.
- Ontong J.C., Singh S., Nwabor O.F., Chusri S., Voravuthikunchai S.P., Potential of antimicrobial topical gel with synthesized biogenic silver nanoparticle using *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and silk sericin, *Biotechnology Letters*, 42(12) (2020), 2653 – 2664.
- Orak H.H., Yagar H., Isbilir S.S., Demirci A.S., Gümüş T., Ekinci N., Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) leaf., *Food Science and Biotechnology*, 20(5) (2011), 1249 – 1256.
- Ortiz D.T., Alcocer G.G., Loske A.M., Fernández F., Becerra E.B., Esparza R., Reyna M.A.G., Estevez M., Green synthesis and antiproliferative activity of gold nanoparticles of a controlled size and shape obtained using shock wave extracts from *Amphipterygium adstringens*, *Bioengineering*, 10 (2023), pp. 437.
- Oszmiański J., Wojdyło A., Nowicka P., Teleszko M., Cebulak T., Wolanin M., Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species, *Molecules*, 20 (2015), 4951 – 4966.
- Ou Q., Huang K., Fu C., Huang C., Fang Y., Gu Z., Wu J., Wang Y., Nanosilver-incorporated halloysite nanotubes/gelatin methacrylate hybrid hydrogel with osteoimmunomodulatory and antibacterial activity for bone regeneration, *Chemical Engineering Journal*, 382 (2020), pp. 123019.
- Ouay B.E., Stellacci F., Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today*, 10(3) (2015), 339 – 354.



- Oyen, M.L., Mechanical characterisation of hydrogel materials, *International Materials Reviews*, 59(1) (2014), 44 – 59.
- Pandian M., Selvaprithviraj V., Pradeep A., Rangasamy J., In-situ silver nanoparticles incorporated N, O-carboxymethyl chitosan based adhesive, self-healing, conductive, antibacterial and antibiofilm hydrogel, *International Journal of Biological Macromolecules*, 188 (2021), 501 – 511.
- Paosen S., Saising J., Septama A.W., Voravuthikunchai S.P., Green synthesis of silver nanoparticles using plants from Myrtaceae family and characterization of their antibacterial activity, *Materials Letters*, 209 (2017), 201.206.
- Parashar S., Garg M., Optimized Green Synthesis of Manilkara zapota Capped Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Application Through Formulation of Nano-gel Systems, *Nano Biomedicine and Engineering*, 15(3) (2023), 262 – 277.
- Parhi, R., Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: a review, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7 (2017), 515 – 530.
- Parthiban E., Manivannan N., Ramnanibai R., Mathivanan N., Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens, *Biotechnology Reports*, 20 (2018), 1 – 10.
- Parveena A., Kulkarni N., Yalagatti M., Abbaraju V., Deshpande R., *In vivo* efficacy of biocompatible silver nanoparticles cream for empirical wound healing, *Journal of Tissue Viability*, 27 (2018), 257 – 261.
- Pasieczna-Patkowska S., Cichy M., Flieger J., Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in Characterization of Green Synthesized Nanoparticles, *Molecules*, 30 (2025), pp. 684.
- Pasparakis G., Recent developments in the use of gold and silver nanoparticles in biomedicine, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14 (2022), pp. 1817.
- Pathania A., Arya R.K., Ahuja S., Crosslinked polymeric coatings: preparation, characterization, and diffusion studies, *Progress in Organic Coatings*, 105 (2017), 149 – 162.
- Patil T.P., Vibhute A.A., Patil S.L., Dongale T.D., Tiwari A.P., Green synthesis of gold nanoparticles via *Capsicum annum* fruit extract: Characterization, antiangiogenic, antioxidant and anti-inflammatory activities, *Applied Surface Science Advances*, 13 (2023), pp. 100372.



- Patra S., Mukherjee S., Barui A.K., Ganguly A., Sreedhar B., Patra C.R., Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics, *Materials Science and Engineering C*, 53 (2015), 298 – 309.
- Patravale V., Dandekar P., Jain R., 4 - Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles, In: Nanoparticulate Drug Delivery Perspectives on the Transition from Laboratory to Market, *Woodhead Publishing Series in Biomedicine*, (2012), 123 – 155.
- Pavlović A.V., Papetti A., Zagorac D.Č.D., Gašić U.M., Mišić D.M., Tešić Ž.Lj., Natić M.M., Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia, *Industrial Crops and Products*, 87 (2016), 304 – 314.
- Pfeifer G. P., You Y. H., Besaratinia A., Mutations induced by ultraviolet light, *Mutation Research*, 571 (2005), 19 – 31.
- Phenrat T., Kim H.J., Fagerlund F., Illangasekare T., Tilton R.D., Lowry G.V., Particle size distribution, concentration, and magnetic attraction affect transport of polymer-modified Fe⁰ nanoparticles in sand columns, *Environmental Science & Technology*, 43 (13) (2009), 5079 – 5085.
- Pirtarighat S., Ghannadnia M., Baghshahi S., Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown *in vitro* and their antibacterial activity assessment, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9 (2019), 1 – 9.
- Pissavini M., Ferrero L., Alaro V., Heinrich U., Tronnier H., Kockott D., Lutz D., Tournier V., Zambonin M., Meloni M., Determination of the *in vitro* SPF, *Cosmetics & Toiletries*, Oak Park, 118 (2003), 63 – 72.
- Pokropivny V.V., Skorokhod V.V., Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science, *Materials Science and Engineering: C*, 27 (2007), 990 – 993.
- Ponder A., Hallmann E., Phenolics and Carotenoid Contents in the Leaves of Different Organic and Conventional Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Cultivars and Their *In Vitro* Activity, *Antioxidants*, 8 (2019), pp. 458.
- Poole C.P., Owens F.J., Introduction to nanotechnology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, (2003).
- Popa R.G., Şchiopu E.C., Pătraşcu A., Bălăcescu A., Toader F.A. Raspberry Production Opportunity to Develop an Agricultural Business in the Context of the Circular Economy: Case Study in South-West Romania, *Agriculture*, 14 (2024), pp. 1822.
- Pouillot A., Polla L.L., Tacchini P., Neequaye A., Polla A., Polla B., Natural antioxidants and their effects on the skin, *John Wiley Sons Inc.*, (2011), 239 – 257.



- Pradeepa M., Harini K., Ruckmani K., Geetha N., Extracellular bio-inspired synthesis of silver nanoparticles using raspberry leaf extract against human pathogens, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(2) (2014), 160 – 165.
- Prenzler P.D., Ryan D., Robards K., Introduction to Basic Principles of Antioxidant Activity, Chapter 1, Handbook of Antioxidant Methodology: Approaches to Activity Determination, *Food Chemistry, Function and Analysis*, 28 (2021), 1 – 62.
- Prociak J.P., Grabowska A., Chwastowski J., Majka T.M., Banach M., Safety of the application of nanosilver and nanogold in topical cosmetic preparations, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183 (2019), pp. 110416.
- Qamar S.U.R., Ahmad J.N., Nanoparticles: Mechanism of biosynthesis using plant extracts, bacteria, fungi, and their applications, *Journal of Molecular Liquids*, 334 (2021), pp. 116040.
- Quadri T.W., Fayemi O.E., Olasunkanmi L.O., Ebenso E.E., Survey of different electrochemical and analytical techniques for corrosion measurement, Chapter 15, Electrochemical and Analytical Techniques for Sustainable Corrosion Monitoring, *Advances, Challenges and Opportunities*, (2023), 293 – 323.
- Quay B.L., Stellacci F., Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today*, 10(3) (2015), 339 – 354.
- Rahdar A., Amini N., Askari F., Susan M.A.B.H., Dynamic light scattering: A useful technique to characterize nanoparticles, *Journal of Nanoanalysis*, 6(2) (2019), 80 – 89.
- Rahmawati D.S., Setiawan I., The formulation and physical stability test of gel fruit strawberry extract (*Fragaria x ananassa* Duch.), *Journal of Nutraceuticals and Herbal Medicine*, 2(1) (2019), 38 – 46.
- Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 27(1) (2009), 76 – 83.
- Rainha N., Kocic K., Coelhoc A.V., Limaa E., Baptistaa J., Fernandes-Ferreira M., HPLC–UV–ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants, *Phytochemistry*, 86, (2012), 83 – 91.
- Raj S., Mali S.C., Trivedi R., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Encicostemma axillare* (Lam.) leaf extract, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503 (2018), 2814 – 2819.
- Ramamurthy C.H., Padma M., Samadanam I.D.M., Mareeswaran R., Suyavaran A., Kumar M.S., Premkumar K., Thirunavukkarasu C., The extracellular synthesis of gold and silver



- nanoparticles and their free radical scavenging and antibacterial properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102 (2013), 808 – 815.
- Rana A., Samtiya M., Dhewa T., Mishra V., Aluko R.E., Health benefits of polyphenols: A concise review, *Journal of Food Biochemistry*, 46 (2022), pp. 14264.
- Rasheed T., Bilal M., Iqbal H.M.N., Li C., Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158 (2017), 408 – 415.
- Rasheed T., Bilal M., Li C., Nabeel F., Khalid M., Iqbal H.M.N., Catalytic potential of bio-synthesized silver nanoparticles using *Convolvulus arvensis* extract for the degradation of environmental pollutants, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 181 (2018), 44 – 52.
- Ravichandran V., Vasanthi S., Shalini S., Shah S.A.A., Harish R., Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity, *Materials Letters*, 180 (2016), 264 – 267.
- Reátegui J.L.P., Machado A.P.F., Barbero G.F., Rezende C.A., Martínez J., Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus sp.*) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound, *The Journal of Supercritical Fluids*, 94 (2014), 223 – 233.
- Reddy G.B., Madhusudhan A., Ramakrishna D., Ayodhya D., Venkatesham M., Veerabhadram G., Green chemistry approach for the synthesis of gold nanoparticles with gum kondagogu: Characterization, catalytic and antibacterial activity, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 5(2) (2015), 185 – 193.
- Rehman W.U., Asim M., Hussain S., Khan S.A., Khan S.B., Hydrogel: A Promising Material in Pharmaceuticals, *Current Pharmaceutical Design*, 26 (2020), 5892 – 5908.
- Rejiya C.S., Cibin T.R., Abraham A., Leaves of *Cassia tora* as a novel cancer therapeutic – An *in vitro* study, *Toxicology in Vitro*, 23 (2009), 1034 – 1038.
- Revathi, S., Sutikno, S., Hasan, A.F., Altemimi, A.B., ALKaisy, Q.H., Phillips, A.J., Hesarinejad, M.A., and Abedelmaksoud, T.G., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNP) using *Acacia nilotica* plant extract and their anti-bacterial activity, *Food Chemistry Advances*, 4 (2024), pp. 100680.
- Rezaei S., Imani R., Highly Absorbent Egg White/Carbomer-940 Hydrofilm as a Potential Diabetic Wound Dressing, *Macromolecular Bioscience*, 24 (2024), pp. 2300353.
- Rónavári A., Igaz N., Adamecz D.I., Szerencsés B., Molnar C., Kónya Z., Pfeiffer I., Kiricsi M. Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications, *Molecules*, 26 (2021), pp. 844.



- Roy S., Mukherjee T., Chakraborty A., Das T.K., Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(1) (2013), 197 – 205.
- Ruffo M., Parisi O.I., Dattilo M., Patitucci F., Malivindi R., Pezzi V., Tzanov T., Puoci F., Synthesis and evaluation of wound healing properties of hydro-diab hydrogel loaded with green-synthesized AGNPS: *in vitro* and *in ex vivo* studies, *Drug Delivery and Translational Research*, 12 (2022), 1881 – 1894.
- Ruiz M.Y.P., de Almeida C.L.A., Agreles A.M.A., Galembeck A., Cavalcanti M.F.I., Advanced Hydrogels Combined with Silver and Gold Nanoparticles against Antimicrobial Resistance, *Antibiotics*, 12 (2023), pp. 104.
- Sabri M.A., Umer A., Awan G.H., Hassan M.F., Hasnain A., Selection of suitable biological method for the synthesis of silver nanoparticles, *Nanomaterials and Nanotechnology*, 6(29) (2016), 1 – 20.
- Sadeghi B., Cholahoseinpoor F., A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134 (2015), 310 – 315.
- Sadeghi B., Mohammadzadeh M., Babakhani B., Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: Characterization and their stability, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148 (2015), 101 – 106.
- Salem S.S., Fouda A., Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview, *Biological Trace Element Research*, 199 (2020), 344 – 370.
- Sancho A., Vázquez L., De-Juan-Pardo E.M., Effect of cold storage on collagen-based hydrogels for the three-dimensional culture of adipose-derived stem cells, *Biofabrication*, 6 (2014), pp. 035017.
- Sanders W.C., Basic Principles of Nanotechnology, *Taylor & Francis Group*, (2019).
- Sandhanasamy D., Elankathirselvan K., AlSalhi A., AlSalhi M.S., Asemi N.N., Aldawsari M., Jhanani G.K., UPLC–ESI–MS/MS profiling of active polyphenolics in *Morinda coreia* leaf extract and *in vitro* antioxidant and antibacterial activity, *Chemosphere*, 323 (2023), pp. 138179.
- Santhosh P.B., Genova J., Chamati H., Green synthesis of gold nanoparticles: An eco-friendly approach, *Chemistry*, 4 (2022), 345 – 369.



- Santhoshkumar J., Rajeshkumar S., Kumar S.V., Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles - A review, *Biochemistry and Biophysics Reports*, (2017), 46 – 57.
- Sathishkumar M., Sneha K., Won S.W., Cho C.-W., Kim S., Yun Y.-S., *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73.2 (2009), 332 – 338.
- Sathiyaraj S., Suriyakala G., Gandhi A.D., Babujanarthanam R., Almaary K.S., Chen T.W., Kaviyarasu K., Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of gold nanoparticles, *Journal of Infection and Public Health*, 14(12) (2021), 1842 – 1847.
- Sayre R.M., Agin P.P., Levee G.J., Marlowe E., Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas, *Photochemistry and Photobiology*, Oxford, 29 (1979), 559 – 566.
- Scandorieiro S., Kimura A.H., de Camargo L.C., Gonçalves M.C., da Silva J.V.H., Risso W.E., de Andrade F.G., Zaia C.T.B.V., Lonni A.A.S.G., dos Reis Martinez C.B., Durán N., Nakazato G., Kobayashi R.K.T., Hydrogel-Containing Biogenic Silver Nanoparticles: Antibacterial Action, Evaluation of Wound Healing, and Bioaccumulation in Wistar Rats, *Microorganisms*, 11(7) (2023), pp. 1815.
- Schade N., Esser C., Krutmann J., Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4(9) (2005), 699 – 708.
- Scimeca M., Bischetti S., Lamsira H.K., Bonfiglio R., Bonanno E., Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis, *European Journal of Histochemistry*, 62(1) (2018), pp. 2841.
- Scimeca M., Orlandi A., Terrenato I., Bischetti S., Bonanno E., Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis, *European Journal of Histochemistry*, 58 (2014), pp. 2403.
- Seleshe S., Lee J.S., Lee S., Lee H.J., Kim G.R., Yeo J., Kim J.Y., Kang S.N., Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of three kinds of strawberries, *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(3) (2017), 203 – 210.
- Senila M., Drolc A., Pintar A., Senila L., Levei E., Validation and measurement uncertainty evaluation of the ICP-OES method for the multi-elemental determination of essential and nonessential elements from medicinal plants and their aqueous extracts, *Journal of Analytical Science and Technology*, 5 (2014), pp. 37.



- Shah P., Goodyear B., Dholaria N., Puri V., Michniak-Kohn B., Nanostructured Non-Ionic Surfactant Carrier-Based Gel for Topical Delivery of Desoximetasone, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2021), pp. 1535.
- Shahzad B., Tanveer M., Rehman A., Cheema S.A., Fahad S., Rehman S., Sharma A., Nickel; whether toxic or essential for plants and environment – A review, *Plant Physiology et Biochemistry*, 132 (2018), 641 – 651.
- Shaikh S.A.M., Singh B.G., Barik A., Balaji N.V., Subbaraju G.V., Naik D.B., Priyadarsini K.I., Unravelling the effect of b-diketo group modification on the antioxidant mechanism of curcumin derivatives: A combined experimental and DFT approach, *Journal of Molecular Structure*, 1193 (2019), 166 – 176.
- Shalka S., dos Reis V.M.S., Sun protection factor: meaning and controversies, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3) (2011), 507 – 515.
- Shariatnia Z., Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120 (2018), 1406 – 1419.
- Sharma S., Bose A., Biswas S., Sen S., Roy I., *Cyperus rotundus* mediated green synthesis of silver nanoparticles for antibacterial wound dressing applications, *Scientific Reports*, 15(1) (2025), pp. 18394.
- Shehzad A., Tariq F., Al Saidi A.K., Khan K.A., Khan S.A., ALshammari F.H., Ul-Islam M., Green-synthesized silver nanoparticle-infused PVA hydrogels: A sustainable solution for skin repair, *Results in Chemistry*, 17 (2025), pp. 102584.
- Shih H., Lin C.-C., Cross-Linking and Degradation of Step-Growth Hydrogels Formed by Thiol – Ene Photoclick Chemistry, *Biomacromolecules*, 13 (2012), 2003 – 2012.
- Shin Y., Lee H.S., Jeong H., Kim D.-H., Recent advances in conductive hydrogels for soft biointegrated electronics: Materials, properties, and device applications, *Wearable Electronics*, 1 (2024), 255 – 280.
- Shnoudeh A.J., Hamad I., Abdo R.W., Qadumii L., Jaber A.Y., Surchi H.S., Alkelany S.Z., Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles, Chapter 15, Biomaterials and Bionanotechnology, *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*, (2019), 527 – 612.
- Shoults-Wilson W.A., Reinsch B.C., Tsyusko O.V., Bertsch P.M., Lowry G.V., Unrine J.M., Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*), *Nanotoxicology*, 5(3) (2011), 432 – 444.



- Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D., Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 18 (2007), 225103 – 225112.
- Sim H.J., Kim J.H., Lee K.R., Hong J., Simultaneous Determination of Structurally Diverse Compounds in Different Fangchi Species by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS, *Molecules*, 18 (2013), 5235 – 5250.
- Singh A., Jain D., Upadhyay M.K., Khandelwal N., Verma H.N., Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(2) (2010), 483 – 489.
- Singh H., Du J., Singh P., Yi T.H., Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(6) (2018), 1163 – 1170.
- Singh J., Dutta T., Kim K.H., Rawat M., Samddar P., Kumar P., ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation, *Journal of Nanobiotechnology*, 16 (2018), pp. 84.
- Singh J., Metha A., Rawat M., Basu S., Green synthesis of silver nanoparticles using sun dried tulsi leaves and its catalytic application for 4-Nitrophenol reduction, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6 (2018), 1468 – 1474.
- Singh M., Kalaivani R., Manikandan S., Sangeetha N., Kumaraguru A.K., Facile green synthesis of variable metallic gold nanoparticle using *Padina gymnospora*, a brown marine macroalga, *Applied Nanoscience*, 3 (2013), 145 – 151.
- Singh S.K., Dhyan A., Juyal D., Hydrogel: Preparation, characterization and applications, *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 6 (2017), pp. 25.
- Sinha S.N., Paul D., Halder N., Sengupta D., Patra S.K., Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity, *Applied Nanoscience*, 5 (2015), 703 – 709.
- Sirivibulkovit K., Nouanthavong S., Sameenoi Y., Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis, *Analytical Sciences*, 34 (2018), 795 – 800.
- Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O., Bach H., Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity, *Journal of Nanobiotechnology*, 15(65) (2017), 1 – 20.
- Snir I. Red Raspberry (*Rubus idaeus*). In: Bajaj, Y.P.S. (eds) Crops II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 6. Springer, Berlin, Heidelberg, (1988).



- Soliman M.K.Y., Salem S.S., Abu-Elghait M., Azab M.S., Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles and Their Efficacy Towards Antibacterial, Antibiofilm, Cytotoxicity, and Antioxidant Activities, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195 (2023), 1158 – 1183.
- Soliman W.E., Elsewedy H.S., Younis N.S., Shynu P., Elsaywy L.E., Ramadan H.A., Evaluating Antimicrobial Activity and Wound Healing Effect of Rod-Shaped Nanoparticles, *Polymers*, 14 (2022), pp. 2637.
- Sosa I.O., Noguez C., Barrera R.G., Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes, *Journal of Physical Chemistry B*, 107(26) (2003), 6269 – 6275.
- Spínola V., Pinto J., Castilho P.C., Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity, *Food Chemistry*, 173 (2015), 14 – 30.
- Stanković M.Z., Stanojević Lj.P., Tehnologija lekovitog i začinskog bilja, Tehnološki fakultet u Leskovcu, (2014), pp. 222.
- Stanojević Lj., Cvetković D., Danilović B., Cakić M., Stanojević D., Antioxidant and antimicrobial activity of aqueous extracts from cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves from Serbia, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, Republic of Macedonia, (2016), pp. 212.
- Stanojević Lj.P., Stanković M.Z., Juma A., Antioxidant activity of aqueous extracts from dill fruit (*Anethi fructus*) obtained by different extraction techniques, *Advanced technologies*, 5(2) (2016), 46 – 52.
- Stanojević Lj.P., Zdravković A.S., Stanković M.Z., Cakić M.D., Nikolić V.D., Ilić D.P., Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.), *Savremene tehnologije* (In Serbian), 2(1) (2013), 51 – 59.
- Stevanović M., Stanojević Lj., Danilović B., Stojanović S., Najman S., Cakić M., Cvetković D., Aqueous extract of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves as a stabilizing agent in the synthesis of bio-active silver nanoparticles, *Chemical Industry*, 74(6) (2021), 365 – 376.
- Stevanović M.S., Zvezdanović J.B., Stanojević L.P., Stanojević J.S., Petrović S.M., Cakić M.D., Cvetković D.J., Synthesis, characterization and antioxidant activity of silver nanoparticles stabilized by aqueous extracts of wild blackberry (*Rubus spp.*) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves, *Advanced Technologies*, 8 (2019), 47 – 58.
- Sujitha M.V., Kannan S., Green synthesis of gold nanoparticles using *Citrus* fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization,



- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102 (2013), 15 – 23.
- Sun Y., Yang C., Tsao R., Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays, Chapter 1, Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications, *John Wiley & Sons*, (2017), 1 – 19.
- Sun Y., Zhong M., Virk M.S., Liu Q., Liang Q., Ma H., Ren X., Extraction Techniques and Modification Methods for Regulating the Structural and Functional Properties of Oleosome-Associated Proteins: A Review, *Foods*, 14(22) (2025), pp. 3849.
- Suriyakala G., Sathiyaraj S., Babujanarthanam R., Alarjani K.M., Hussein D.S., Rasheed R.A., Kanimozhi K., Green synthesis of gold nanoparticles using *Jatropha integerrima* Jacq. flower extract and their antibacterial activity, *Journal of King Saud University - Science*, 34(3) (2022), pp. 101830.
- Taiz L., Zeiger E., Møller I.M., Murphy A., Plant Physiology and Development. 6th ed. Sunderland: Sinauer Associates; (2017).
- Tamboli D.P., Lee D.S., Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly-synthesized silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Journal of Hazardous Materials*, 260 (2013), 878 – 884.
- Tamboli F., Nadaf S., Mulani S., Gaikwad D., More H., Tamboli A., Gurav S., *Brugmansia suaveolens* leaf and flower-derived Silver nanoparticle gel with antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory potency, *International Journal of Nano Dimension*, 16(1) (2025), 1 – 19.
- Tang S., Zheng J., Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects, *Advanced Healthcare Materials*, 7(13) (2018), pp. 1701503.
- Tang Y., Xu H., Wang X., Dong S., Guo L., Zhang S., Yang X., Liu C., Jiang X., Kan M., Wu S., Zhang J., Xu C., Advances in preparation and application of antibacterial hydrogels, *Journal of Nanobiotechnology*, 21 (2023), pp. 300.
- Tasić M.S., Petrović S.M., Simonović N.M., Pavlović D.R., Milenković A.N., Stanojević Lj.P., Cvetković D.J., Stability, bioactivity and sun protective potential of hydrogels based on silver nanoparticles stabilized by aqueous extracts of blackberry (*Rubus spp.*) leaves, *Nanobiotechnology Reports*, 21(2) (2026), 219 – 242.
- Tasić M.S., Zvezdanović J.B., Stanojević L.P., Stanojević J.S., Petrović S.M., Danilović B., Cvetković D.J., Characterization and Biological Activity of Silver Nanoparticles Stabilized by Aqueous Extracts of *Rubus spp.* Leaves, *Colloid Journal*, 88 (2026), 68 – 79.



- Tasić M.S., Zvezdanović J.B., Stanojević L.P., Stanojević J.S., Petrović S.M., Danilović B., Cvetković, D.J., Synthesis, characterization and biological activity of gold nanoparticles stabilized by aqueous extracts of wild blackberry (*Rubus Spp.*) leaves, *Colloid Journal*, 86(5) (2024), 1 – 15.
- Tavan M., Hanachi P., Mirjalili M.H., Dashtbani-Roozbehani A., Comparative assessment of the biological activity of the green synthesized silver nanoparticles and aqueous leaf extract of *Perilla frutescens* (L.), *Scientific Reports*, 13 (2023), pp. 6391.
- Teixeira L.S.M., Feijen J., van Blitterswijk C.A., Dijkstra P.J., Karperien M., Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering, *Biomaterials*, 33 (2012), 1281 – 1290.
- Thang N.H., Chien T.B., Cuong D.X., Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview, *Gels*, 9 (2023), pp. 523.
- Thongwattana T., Chaiyo R., Ponsanti K., Tangnorawich B., Pratumpong P., Toommee S., Jenjob R., Yang S.-G., Parcharoen Y., Natphopsuk S., Pechyen C., Synthesis of Silver Nanoparticles and Gold Nanoparticles Used as Biosensors for the Detection of Human Serum Albumin-Diagnosed Kidney Disease, *Pharmaceuticals*, 17 (2024), pp. 1421.
- Tsang V.L., Bhatia S.N., Three-dimensional tissue fabrication, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004), 1635 – 1647.
- Tyagi P.K., Quispe C., Herrera-Bravo J., Tyagi S., Mrunal D.B., Kumar M., Dablood A.S., Alghamdi S., Batiha G.El-S., Sharifi-Rad J., Ramniwas S., Synthesis of silver and gold nanoparticles: chemical and green synthesis method and its toxicity evaluation against pathogenic bacteria using the ToxTrak test, *Journal of Nanomaterials*, 2021 (2021), pp. 12.
- Ul-Hamid A., A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy, Springer Nature Switzerland, (2018).
- Ullah F., Othman M. B., Javed F., Ahmad Z., Md Akil H., Classification, processing and application of hydrogels: a review, *Materials Science and Engineering: C*, 57 (2015), 414 – 433.
- Ur Rehman W.S.A.K., Ahmad Z., Khattak M.T.N., Hussain S., Al-Ghamdi Y.O., Jabli M., Anwar Y., Advances in Nanotherapeutic Agents. In *Nanotherapeutic Strategies and New Pharmaceuticals (Part 1)*, Bentham Sciences: Al Sharjah, United Arab Emirates, (2021), 1 – 16.



- Usman O., Baig M.M.M., Ikram M., Iqbal T., Islam S., Syed W., Al.Rawi M.B., Naseem M., Green synthesis of metal nanoparticles and study their anti-pathogenic properties against pathogens effect on plants and animals, *Scientific Reports*, 14 (2024), pp. 11354.
- Velgosova O., Mražiková A., Čižmarová E., Málek J., Green synthesis of Ag nanoparticles: Effect of algae life cycle on Ag nanoparticle production and long-term stability, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 28 (2018), 974 – 979.
- Veljković B., Đorđević N., Dolićanin Z., Ličina B., Topuzović M., Stanković M., Zlatić N., Stevanović Z.D., Antioxidant and anticancer properties of leaf and fruit extracts of the wild raspberry (*Rubus idaeus* L.), *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2) (2019), 359 – 367.
- Veljković V., Milenović D., Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, *Hemijska industrija*, 56(2) (2002), 60 – 67.
- Verma A., Mehata M. SControllable Synthesis of Silver Nanoparticles Using Neem Leaves and Their Antimicrobial Activity, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences.*, 9 (2016), 109 – 115.
- Vijayan R., Joseph S., Mathew B., Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced antimicrobial, antioxidant, and catalytic activities, *IET Nanobiotechnology*, 12(6) (2018), 850 – 856.
- Vijayan R., Joseph S., Mathew B., *Indigofera tinctoria* leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles and assessment of their anticancer, antimicrobial, antioxidant and catalytic properties, *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46 (2018), 861 – 871.
- Vijayaram S., Razafindralambo H., Sun Y.Z., Vasantharaj S., Ghafarifarsani H., Hoseinifar S.H., Raeeszadeh M., Applications of green synthesized metal nanoparticles – a Review, *Biological Trace Element Research*, 202 (2024), 360 – 386.
- Vinodkumar T., Dinesh T., Ghosh K., A comprehensive analysis of minerals in *Moringa oleifera* leaves, seeds, stem bark, and ash using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES), *Discover Chemistry*, 2(36) (2025).
- Visan A.I., Popescu-Pelin G., Socol G., Degradation Behavior of Polymers Used as Coating Materials for Drug Delivery – A Basic Review, *Polymers*, 13 (2021), pp. 1272.
- Viscido A., Capannolo A., Latella G., Caprilli R., Frieri G., Nanotechnology in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases, *Journal of Crohn's & Colitis*, 8 (2014), 903 – 918.



- Vogeser M., Parhofer K.G., Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS / MS) – Technique and Applications in Endocrinology, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 115 (2007), 559 – 570.
- Wahid F., Zhong C., Wang H.-S., Hu X.-H., Chu L.-Q., Recent Advances in Antimicrobial Hydrogels Containing Metal Ions and Metals/Metal Oxide Nanoparticles, *Polymers*, 9(12) (2017), pp. 636.
- Wall J., Antioxidants in prevention of reperfusion damage of vascular endothelium, *Pharmacology*, 1 (2000), 67 – 71.
- Walters C., Keeney A., Wigal C.T., Johnstom C.R., Cornelius R.D., The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens, *Journal of Chemical Education*, Washington, 74 (1997), 99 – 102.
- Wang L., Kafshgari M.H., Meunier M., Optical Properties and Applications of Plasmonic-Metal Nanoparticles, *Advanced Functional Materials*, 30 (2020), pp. 2005400.
- Wang L., Wu Y., Xie J., Wu S., Wu Z., Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts, *Materials Science and Engineering: C*, 86 (2018), 1 – 8.
- Wang R., Cheng C., Wang H., Wang D., Swollen hydrogel nanotechnology: Advanced applications of the rudimentary swelling properties of hydrogels, *Materials Chemistry and Physics*, 3 (2024), 357 – 375.
- Wang T., Zheng Y., Shi Y., Zhao L., pH-responsive calcium alginate hydrogel laden with protamine nanoparticles and hyaluronan oligosaccharide promotes diabetic wound healing by enhancing angiogenesis and antibacterial activity, *Drug Delivery and Translational Research*, 9 (2019), 227 – 239.
- Wang W., Narain R., Zeng H., Hydrogels, Chapter 10, Polymer Science and Nanotechnology, *Fundamentals and Applications*, (2020), 203 – 244.
- Weiss J.N., Dynamic Light Scattering Spectroscopy of the Human Eye, Springer Nature Switzerland AG, (2022), 1 – 95.
- Wirwis A., Sadowski Z., Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Optimizing Green Tea Leaf Extraction for Enhanced Physicochemical Properties, *ACS Omega*, 8 (2023), 30532 – 30549.
- Wlaschek M., Tantcheva-Poor I., Naderi L., Ma W., Schneider L.A., Razi-Wolf Z., Schuller J., Scharffetter Kochanek K., Solar UV irradiation and dermal photoaging, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63 (2001), 41 – 51.



- Xie X., Liao J., Shao X., Li Q., Lin Y., The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, rods, and triangles, *Scientific Reports*, 7(1) (2017), pp. 3827.
- Xiu Z.M., Ma J., Alvarez P.J.J., Differential Effect of Common Ligands and Molecular Oxygen on Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles versus Silver Ions, *Environmental Science & Technology*, 45(20) (2011), 9003 – 9008.
- Yang S., Zhou Y., Zhao Y., Wang D., Luan Y., Microwave synthesis of graphene oxide decorated with silver nanoparticles for slow-release antibacterial hydrogel, *Materials Today Communications*, 31 (2022), pp. 103663.
- Yang X., Yang J., Wang L., Ran B., Jia Y., Zhang L., Yang G., Shao H., Jiang X., Pharmaceutical Intermediate-Modified Gold Nanoparticles: Against Multidrug-Resistant Bacteria and Wound-Healing Application via an Electrospun Scaffold, *ACS Nano*, 11 (2017), 5737 – 5745.
- Yilmaz M., Turkdemir H., Kilic M.A., Bayram E., Cicek A., Mete A., Ulug B., Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*, *Materials Chemistry and Physics*, 130 (2011), 1195 – 1202.
- Ying S., Guan Z., Ofoegbu P.C., Clubb P., Rico C., Hong, J., Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations, *Environmental Technology & Innovation*, 26(1) (2022), pp. 102336.
- Yuan C.G., Huo C., Gui B., Cao W.P., Green synthesis of gold nanoparticles using *Citrus maxima* peel extract and their catalytic/antibacterial activities, *IET Nanobiotechnology*, 11(5) (2017), 523 – 530.
- Young A.R., Acute effects of UVR on human eyes and skin, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1) (2006), 80 – 85.
- Zakzak K., Semenescu A.-D., Moacă E.-A., Predescu I., Drăghici G., Vlaia L., Vlaia V., Borcan F., Dehelean C.-A., Comprehensive Biosafety Profile of Carbomer-Based Hydrogel Formulations Incorporating Phosphorus Derivatives, *Gels*, 10 (2024), pp. 477.
- Zayed M.F., Mahfoze R.A., El-kousy S.M., El-Ashkar E.A., *In-vitro* antioxidant and antimicrobial activities of metal nanoparticles biosynthesized using optimized *Pimpinella anisum* extract, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 585 (2019), pp. 124167.
- Zhang D., Ma X.-l., Gu Y., Huang H., Zhang G.-W., Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer, *Frontiers in Chemistry*, 8 (2020), pp. 799.



- Zhang M., Zhao J., Dai X., Li X., Extraction and analysis of chemical compositions of natural products and plants, *Separations*, 10 (2023), pp. 598.
- Zhang Q., Liu Y., Yang G., Kong H., Guo L., Wei G., Recent advances in protein hydrogels: From design, structural and functional regulations to healthcare applications, *Chemical Engineering Journal*, 451 (2023), pp. 138494.
- Zhang R., Tang M., Bowyer A., Eiseenthal R., Hubble J., A novel pH- and ionic-strength-sensitive carboxy methyl dextran hydrogel, *Biomaterials*, 26 (2005), 4677 – 4683.
- Zhang Y., Huang Y., Rational Design of Smart Hydrogels for Biomedical Applications, *Frontiers in Chemistry*, 8 (2021), pp. 615665.
- Zhang Y., Leu Y.R., Aitken R.J., Riediker A.M. Inventory of Engineered Nanoparticle-Containing Consumer Products Available in the Singapore Retail Market and Likelihood of Release into the Aquatic Environment, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 (2015), 8717 – 8743.
- Zhang Y., Lou Z., Zhang X., Hu X., Zhang H., A simple strategy to fabricate poly (acrylamide-co-alginate)/gold nanocomposites for inactivation of bacteria, *Applied Physics A*, 117 (2014), 2009 – 2018.
- Zhang Y., Yang D., Kong Y., Wang X., Pandoli O., Gao G., Synergetic antibacterial effects of silver nanoparticles *Aloe Vera* prepared via a green method, *Nano Biomedicine and Engineering*, 2(4) (2010), 252 – 257.
- Zhou C., Wu T., Xie X., Song G., Ma X., Mu Q., Huang Z., Liu X., Sun C., Xu W., Advances and challenges in conductive hydrogels: From properties to applications, *European Polymer Journal*, 177 (2022), pp. 111454.
- Zhou Y., Tang R.C., Facile and eco-friendly fabrication of AgNPs coated silk for antibacterial and antioxidant textiles using honeysuckle extract, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 178 (2018), 463 – 471.
- Zuhrotun A., Oktaviani D.J., Hasanah A.N., Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Phytochemical Compounds, *Molecules*, 28 (2023), pp. 3240.
- Żurek N., Adamczyk G., Interactions of Polyphenolic Compounds with Gelling Agents: Health-Promoting Properties and Application in Food Systems, *Gels*, 12(1) (2026), pp. 30.
- Zvereva M., AuNP-Containing Hydrogels Based on Arabinogalactan and κ -Carrageenan with Antiradical Activity, *Gels*, 12(1) (2026), pp. 9.



7 ПРИЛОГ

Табела П1 Тест хомогености варијансе за рН при 22°C хидрогелова са наночестицама сребра

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
1	O'Brien[.5]	0.5010	6	14	0.7976
	Brown-Forsythe	0.4225	6	14	0.8520
	Levene	0.5307	6	14	0.7762
	Bartlett	0.4338	6	.	0.8568
7	O'Brien[.5]	0.4599	6	14	0.8265
	Brown-Forsythe	0.3101	6	14	0.9212
	Levene	0.3732	6	14	0.8840
	Bartlett	0.2921	6	.	0.9410
15	O'Brien[.5]	0.3013	6	14	0.9260
	Brown-Forsythe	0.1981	6	14	0.9719
	Levene	0.3854	6	14	0.8763
	Bartlett	0.2295	6	.	0.9672
45	O'Brien[.5]	0.7759	6	14	0.6019
	Brown-Forsythe	0.4590	6	14	0.8271
	Levene	0.7552	6	14	0.6161
	Bartlett	0.4791	6	.	0.8244
60	O'Brien[.5]	0.4331	6	14	0.8448
	Brown-Forsythe	0.3399	6	14	0.9043
	Levene	0.6099	6	14	0.7190
	Bartlett	0.4084	6	.	0.8740
90	O'Brien[.5]	0.9257	6	14	0.5060
	Brown-Forsythe	0.6523	6	14	0.6884
	Levene	2.2532	6	14	0.0987
	Bartlett	1.1229	6	.	0.3458
180	O'Brien[.5]	0.7759	6	14	0.6019
	Brown-Forsythe	0.4632	6	14	0.8241
	Levene	1.1393	6	14	0.3902
	Bartlett	0.6285	6	.	0.7076
365	O'Brien[.5]	0.4354	6	14	0.8433
	Brown-Forsythe	0.2713	6	14	0.9413
	Levene	0.4669	6	14	0.8215
	Bartlett	0.3176	6	.	0.9282



Табела П2 Тест хомогености варијансе за рН при 4°C хидрогелова са наночестицама сребра

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
1	O'Brien[.5]	0.0532	6	14	0.9992
	Brown-Forsythe	0.0282	6	14	0.9999
	Levene	0.0222	6	14	0.9999
	Bartlett	0.024	6	.	0.9999
7	O'Brien[.5]	0.5502	6	14	0.7622
	Brown-Forsythe	0.3450	6	14	0.9013
	Levene	0.6164	6	14	0.7143
	Bartlett	0.3534	6	.	0.9083
15	O'Brien[.5]	0.2375	6	14	0.9567
	Brown-Forsythe	0.1566	6	14	0.9843
	Levene	0.2241	6	14	0.9622
	Bartlett	0.1488	6	.	0.9894
45	O'Brien[.5]	0.1878	6	14	0.9753
	Brown-Forsythe	0.0722	6	14	0.9980
	Levene	0.2981	6	14	0.9277
	Bartlett	0.1298	6	.	0.9926
60	O'Brien[.5]	0.5866	6	14	0.7359
	Brown-Forsythe	0.4557	6	14	0.8294
	Levene	0.8105	6	14	0.5788
	Bartlett	0.5307	6	.	0.7854
90	O'Brien[.5]	1.1223	6	14	0.3985
	Brown-Forsythe	1.0249	6	14	0.4491
	Levene	1.3476	6	14	0.3009
	Bartlett	1.1055	6	.	0.3561
180	O'Brien[.5]	0.1531	6	14	0.9852
	Brown-Forsythe	0.0513	6	14	0.9992
	Levene	0.2469	6	14	0.9526
	Bartlett	0.0792	6	.	0.9981
365	O'Brien[.5]	0.3317	6	14	0.9090
	Brown-Forsythe	0.1808	6	14	0.9775
	Levene	0.2989	6	14	0.9273
	Bartlett	0.1793	6	.	0.9826



Табела ПЗ Тест хомогености варијансе вискозности при 22°C хидрогелова са наночестицама сребра

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
1	O'Brien[.5]	0.4987	6	14	0.7992
	Brown-Forsythe	0.4323	6	14	0.8454
	Levene	0.4846	6	14	0.8092
	Bartlett	0.4428	6	.	0.8505
7	O'Brien[.5]	0.5244	6	14	0.7808
	Brown-Forsythe	0.3333	6	14	0.9081
	Levene	0.4177	6	14	0.8552
	Bartlett	0.2978	6	.	0.9382
15	O'Brien[.5]	0.6244	6	14	0.7084
	Brown-Forsythe	0.4746	6	14	0.8162
	Levene	0.5549	6	14	0.7588
	Bartlett	0.4684	6	.	0.8322
45	O'Brien[.5]	0.5062	6	14	0.7938
	Brown-Forsythe	0.3270	6	14	0.9117
	Levene	0.3474	6	14	0.8998
	Bartlett	0.2992	6	.	0.9376
60	O'Brien[.5]	0.3502	6	14	0.8981
	Brown-Forsythe	0.3270	6	14	0.9117
	Levene	0.4297	6	14	0.8472
	Bartlett	0.3822	6	.	0.8908
90	O'Brien[.5]	0.5317	6	14	0.7756
	Brown-Forsythe	0.5507	6	14	0.7618
	Levene	0.5271	6	14	0.7788
	Bartlett	0.5975	6	.	0.7327
180	O'Brien[.5]	0.9245	6	14	0.5067
	Brown-Forsythe	0.7952	6	14	0.5889
	Levene	0.9107	6	14	0.5151
	Bartlett	0.7764	6	.	0.5883
365	O'Brien[.5]	0.5481	6	14	0.7637
	Brown-Forsythe	0.5388	6	14	0.7705
	Levene	0.6260	6	14	0.7073
	Bartlett	0.5827	6	.	0.7445



Табела П4 Тест хомогености варијансе вискозности при 4°C хидрогелова са наночестицама сребра

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
1	O'Brien[.5]	0.6757	6	14	0.6716
	Brown-Forsythe	0.5385	6	14	0.7707
	Levene	0.7552	6	14	0.6160
	Bartlett	0.5695	6	.	0.7550
7	O'Brien[.5]	0.8163	6	14	0.5750
	Brown-Forsythe	0.4635	6	14	0.8239
	Levene	1.2687	6	14	0.3321
	Bartlett	0.6048	6	.	0.7267
15	O'Brien[.5]	0.4132	6	14	0.8582
	Brown-Forsythe	0.2778	6	14	0.9381
	Levene	0.4000	6	14	0.8669
	Bartlett	0.2708	6	.	0.9508
45	O'Brien[.5]	0.1699	6	14	0.9808
	Brown-Forsythe	0.1004	6	14	0.9951
	Levene	0.1282	6	14	0.9906
	Bartlett	0.0915	6	.	0.9972
60	O'Brien[.5]	0.3914	6	14	0.8724
	Brown-Forsythe	0.3270	6	14	0.9117
	Levene	0.3474	6	14	0.8998
	Bartlett	0.3262	6	.	0.9236
90	O'Brien[.5]	0.4738	6	14	0.8168
	Brown-Forsythe	0.4145	6	14	0.8573
	Levene	0.8472	6	14	0.5549
	Bartlett	0.6313	6	.	0.7053
180	O'Brien[.5]	0.4387	6	14	0.8410
	Brown-Forsythe	0.2909	6	14	0.9314
	Levene	0.7237	6	14	0.6378
	Bartlett	0.4394	6	.	0.8529
365	O'Brien[.5]	0.5050	6	14	0.7947
	Brown-Forsythe	0.3939	6	14	0.8708
	Levene	0.5149	6	14	0.7876
	Bartlett	0.4040	6	.	0.8769



Табела П5 Тест хомогености варијансе електричне проводљивости при 22 °C хидрогелова са наночестицама сребра

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
1	O'Brien[.5]	0,3496	6	14	0,8985
	Brown-Forsythe	0,2116	6	14	0,9670
	Levene	0,2412	6	14	0,9551
	Bartlett	0,1881	6	.	0,9803
7	O'Brien[.5]	0,7817	6	14	0,5980
	Brown-Forsythe	0,5676	6	14	0,7496
	Levene	0,9067	6	14	0,5176
	Bartlett	0,5903	6	.	0,7384
15	O'Brien[.5]	0,4138	6	14	0,8578
	Brown-Forsythe	0,3081	6	14	0,9223
	Levene	0,3590	6	14	0,8928
	Bartlett	0,3042	6	.	0,9350
45	O'Brien[.5]	0,7980	6	14	0,5871
	Brown-Forsythe	0,5705	6	14	0,7475
	Levene	0,9530	6	14	0,4898
	Bartlett	0,5879	6	.	0,7403
60	O'Brien[.5]	0,9103	6	14	0,5154
	Brown-Forsythe	0,5758	6	14	0,7437
	Levene	0,7075	6	14	0,6492
	Bartlett	0,4902	6	.	0,8162
90	O'Brien[.5]	0,4271	6	14	0,8489
	Brown-Forsythe	0,2706	6	14	0,9416
	Levene	0,3447	6	14	0,9014
	Bartlett	0,2431	6	.	0,9622
180	O'Brien[.5]	0,6232	6	14	0,7093
	Brown-Forsythe	0,3917	6	14	0,8723
	Levene	0,5714	6	14	0,7468
	Bartlett	0,3727	6	.	0,8967
365	O'Brien[.5]	0,1977	6	14	0,9720
	Brown-Forsythe	0,1111	6	14	0,9936
	Levene	0,1584	6	14	0,9839
	Bartlett	0,0977	6	.	0,9966



Табела П6 Тест хомогености варијансе електричне проводљивости при 4°C хидрогелова са наночестицама сребра

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
1	O'Brien[.5]	1,0337	6	14	0,4443
	Brown-Forsythe	0,7742	6	14	0,6031
	Levene	0,9715	6	14	0,4790
	Bartlett	0,7256	6	.	0,6289
7	O'Brien[.5]	0,6748	6	14	0,6723
	Brown-Forsythe	0,4744	6	14	0,8164
	Levene	0,7467	6	14	0,6219
	Bartlett	0,5556	6	.	0,7659
15	O'Brien[.5]	0,5413	6	14	0,7686
	Brown-Forsythe	0,5088	6	14	0,7920
	Levene	0,7454	6	14	0,6228
	Bartlett	0,5865	6	.	0,7414
45	O'Brien[.5]	0,3043	6	14	0,9243
	Brown-Forsythe	0,1806	6	14	0,9776
	Levene	0,1828	6	14	0,9769
	Bartlett	0,1569	6	.	0,9877
60	O'Brien[.5]	0,1178	6	14	0,9925
	Brown-Forsythe	0,0754	6	14	0,9978
	Levene	0,0865	6	14	0,9967
	Bartlett	0,0689	6	.	0,9987
90	O'Brien[.5]	0,1839	6	14	0,9766
	Brown-Forsythe	0,1093	6	14	0,9939
	Levene	0,1686	6	14	0,9811
	Bartlett	0,1062	6	.	0,9957
180	O'Brien[.5]	0,5283	6	14	0,7780
	Brown-Forsythe	0,3756	6	14	0,8825
	Levene	0,4990	6	14	0,7990
	Bartlett	0,3696	6	.	0,8987
365	O'Brien[.5]	0,3731	6	14	0,8841
	Brown-Forsythe	0,2080	6	14	0,9684
	Levene	0,4485	6	14	0,8344
	Bartlett	0,2435	6	.	0,9620

**Табела П7** Тест хомогености варијансе за рН при 22°C хидрогелова са наночестицама злата

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
2	O'Brien[.5]	0,7264	4	10	0,5938
	Brown-Forsythe	0,4778	4	10	0,7517
	Levene	0,6119	4	10	0,6636
	Bartlett	0,4199	4		0,7944
8	O'Brien[.5]	0,5997	4	10	0,6714
	Brown-Forsythe	0,4000	4	10	0,8045
	Levene	0,4336	4	10	0,7817
	Bartlett	0,3729	4		0,8282
16	O'Brien[.5]	0,0524	4	10	0,9940
	Brown-Forsythe	0,0270	4	10	0,9983
	Levene	0,0158	4	10	0,9994
	Bartlett	0,0220	4		0,9991
30	O'Brien[.5]	0,2865	4	10	0,8801
	Brown-Forsythe	0,1358	4	10	0,9653
	Levene	0,3088	4	10	0,8657
	Bartlett	0,1605	4		0,9583
65	O'Brien[.5]	0,6489	4	10	0,6404
	Brown-Forsythe	0,3378	4	10	0,8464
	Levene	1,1379	4	10	0,3930
	Bartlett	0,5115	4		0,7273
98	O'Brien[.5]	0,1723	4	10	0,9476
	Brown-Forsythe	0,1020	4	10	0,9792
	Levene	0,1318	4	10	0,9671
	Bartlett	0,0911	4		0,9853
120	O'Brien[.5]	0,6292	4	10	0,6527
	Brown-Forsythe	0,1758	4	10	0,9458
	Levene	1,0234	4	10	0,4410
	Bartlett	0,3367	4		0,8534
150	O'Brien[.5]	0,1723	4	10	0,9476
	Brown-Forsythe	0,1020	4	10	0,9792
	Levene	0,1318	4	10	0,9671
	Bartlett	0,0911	4		0,9853
365	O'Brien[.5]	0,2483	4	10	0,9042
	Brown-Forsythe	0,1607	4	10	0,9535
	Levene	0,1699	4	10	0,9489
	Bartlett	0,1445	4		0,9655



Табела П8 Тест хомогености варијансе за рН при 4°C хидрогелова са наночестицама злата

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
2	O'Brien[.5]	0,3733	4	10	0,8226
	Brown-Forsythe	0,3111	4	10	0,8641
	Levene	0,3887	4	10	0,8121
	Bartlett	0,3191	4		0,8654
8	O'Brien[.5]	0,8183	4	10	0,5420
	Brown-Forsythe	0,5517	4	10	0,7025
	Levene	0,8324	4	10	0,5345
	Bartlett	0,5328	4		0,7116
16	O'Brien[.5]	0,6716	4	10	0,6265
	Brown-Forsythe	0,5098	4	10	0,7302
	Levene	0,6744	4	10	0,6248
	Bartlett	0,5044	4		0,7326
30	O'Brien[.5]	0,0524	4	10	0,9940
	Brown-Forsythe	0,0270	4	10	0,9983
	Levene	0,0158	4	10	0,9994
	Bartlett	0,0220	4		0,9991
65	O'Brien[.5]	0,1715	4	10	0,9480
	Brown-Forsythe	0,1290	4	10	0,9683
	Levene	0,1946	4	10	0,9357
	Bartlett	0,1347	4		0,9696
98	O'Brien[.5]	0,4322	4	10	0,7826
	Brown-Forsythe	0,2571	4	10	0,8987
	Levene	0,4746	4	10	0,7539
	Bartlett	0,3118	4		0,8702
120	O'Brien[.5]	0,7163	4	10	0,5997
	Brown-Forsythe	0,4375	4	10	0,7790
	Levene	0,7983	4	10	0,5529
	Bartlett	0,4410	4		0,7790
150	O'Brien[.5]	0,8928	4	10	0,5030
	Brown-Forsythe	0,6638	4	10	0,6313
	Levene	1,0828	4	10	0,4154
	Bartlett	0,6980	4		0,5932
365	O'Brien[.5]	1,7109	4	10	0,2239
	Brown-Forsythe	0,8358	4	10	0,5326
	Levene	10,3930	4	10	0,0014*
	Bartlett	3,4843	4		0,0075*



Табела П9 Тест хомогености варијансе вискозности при 22°C хидрогелова са наночестицама злата

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
2	O'Brien[.5]	0,1383	4	10	0,9642
	Brown-Forsythe	0,0778	4	10	0,9874
	Levene	0,0885	4	10	0,9840
	Bartlett	0,0668	4		0,9918
8	O'Brien[.5]	0,2835	4	10	0,8821
	Brown-Forsythe	0,1812	4	10	0,9430
	Levene	0,2053	4	10	0,9296
	Bartlett	0,1653	4		0,9560
16	O'Brien[.5]	0,3139	4	10	0,8623
	Brown-Forsythe	0,1758	4	10	0,9458
	Levene	0,2146	4	10	0,9243
	Bartlett	0,1496	4		0,9632
30	O'Brien[.5]	0,4741	4	10	0,7542
	Brown-Forsythe	0,3000	4	10	0,8714
	Levene	0,3508	4	10	0,8377
	Bartlett	0,2659	4		0,9000
65	O'Brien[.5]	0,9297	4	10	0,4847
	Brown-Forsythe	0,8830	4	10	0,5080
	Levene	1,0083	4	10	0,4478
	Bartlett	0,8835	4		0,4727
98	O'Brien[.5]	0,2566	4	10	0,8991
	Brown-Forsythe	0,1525	4	10	0,9575
	Levene	0,2534	4	10	0,9011
	Bartlett	0,1489	4		0,9636
120	O'Brien[.5]	1,3892	4	10	0,3057
	Brown-Forsythe	1,3616	4	10	0,2649
	Levene	1,3616	4	10	0,2649
	Bartlett	1,2836	4		0,2738
150	O'Brien[.5]	0,8448	4	10	0,5278
	Brown-Forsythe	0,3795	4	10	0,8183
	Levene	2,3080	4	10	0,1292
	Bartlett	1,0133	4		0,3988
365	O'Brien[.5]	0,3278	4	10	0,8531
	Brown-Forsythe	0,2162	4	10	0,9234
	Levene	0,2720	4	10	0,8894
	Bartlett	0,2012	4		0,9378



Табела П10 Тест хомогености варијансе вискозности при 4°C хидрогелова са наночестицама злата

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
2	O'Brien[.5]	0,4163	3	8	0,7462
	Brown-Forsythe	0,2667	3	8	0,8477
	Levene	0,4286	3	8	0,7381
	Bartlett	0,2643	3		0,8511
8	O'Brien[.5]	0,3398	3	8	0,7974
	Brown-Forsythe	0,1863	3	8	0,9028
	Levene	0,2449	3	8	0,8627
	Bartlett	0,1652	3		0,9199
16	O'Brien[.5]	0,5880	3	8	0,6398
	Brown-Forsythe	0,4167	3	8	0,7459
	Levene	0,7222	3	8	0,5664
	Bartlett	0,4437	3		0,7218
30	O'Brien[.5]	0,6074	3	8	0,6286
	Brown-Forsythe	0,5180	3	8	0,6815
	Levene	1,0660	3	8	0,4161
	Bartlett	0,7048	3		0,5490
65	O'Brien[.5]	0,7150	3	8	0,5701
	Brown-Forsythe	0,4954	3	8	0,6955
	Levene	0,8971	3	8	0,4836
	Bartlett	0,5672	3		0,6366
98	O'Brien[.5]	0,3558	3	8	0,7865
	Brown-Forsythe	0,2432	3	8	0,8639
	Levene	0,3678	3	8	0,7784
	Bartlett	0,2314	3		0,8745
120	O'Brien[.5]	0,4710	3	8	0,7108
	Brown-Forsythe	0,2019	3	8	0,8922
	Levene	0,5789	3	8	0,6451
	Bartlett	0,2279	3		0,8770
150	O'Brien[.5]	0,4909	3	8	0,6983
	Brown-Forsythe	0,3750	3	8	0,7736
	Levene	1,2305	3	8	0,3604
	Bartlett	0,6468	3		0,5849
365	O'Brien[.5]	0,1147	3	8	0,9490
	Brown-Forsythe	0,0357	3	8	0,9903
	Levene	0,1983	3	8	0,8946
	Bartlett	0,0655	3		0,9782



Табела П11 Тест хомогености варијансе електричне проводљивости при 22 °C хидрогелова са наночестицама злата

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
2	O'Brien[.5]	0,4591	4	10	0,7643
	Brown-Forsythe	0,2547	4	10	0,9002
	Levene	0,3111	4	10	0,8641
	Bartlett	0,2140	4		0,9308
8	O'Brien[.5]	0,6687	4	10	0,6282
	Brown-Forsythe	0,7051	4	10	0,6063
	Levene	0,9263	4	10	0,4864
	Bartlett	0,8076	4		0,5200
16	O'Brien[.5]	0,5972	4	10	0,6730
	Brown-Forsythe	0,4304	4	10	0,7838
	Levene	0,5322	4	10	0,7154
	Bartlett	0,3983	4		0,8100
30	O'Brien[.5]	0,1910	4	10	0,9376
	Brown-Forsythe	0,1277	4	10	0,9689
	Levene	0,2053	4	10	0,9297
	Bartlett	0,1288	4		0,9720
65	O'Brien[.5]	0,5119	4	10	0,7288
	Brown-Forsythe	0,3426	4	10	0,8432
	Levene	0,4559	4	10	0,7665
	Bartlett	0,3146	4		0,8684
98	O'Brien[.5]	0,1147	4	10	0,9744
	Brown-Forsythe	0,0686	4	10	0,9900
	Levene	0,0930	4	10	0,9825
	Bartlett	0,0613	4		0,9931
120	O'Brien[.5]	0,6405	4	10	0,6456
	Brown-Forsythe	0,4477	4	10	0,7721
	Levene	0,4741	4	10	0,7542
	Bartlett	0,3982	4		0,8101
150	O'Brien[.5]	0,3682	4	10	0,8260
	Brown-Forsythe	0,2500	4	10	0,9032
	Levene	0,2845	4	10	0,8814
	Bartlett	0,2273	4		0,9232
365	O'Brien[.5]	0,2392	4	10	0,9098
	Brown-Forsythe	0,1414	4	10	0,9628
	Levene	0,1710	4	10	0,9483
	Bartlett	0,1232	4		0,9742



Табела П12 Тест хомогености варијансе електричне проводљивости при 4°C хидрогелова са наночестицама злата

Време (дан)	Тест	F-однос	DFNum	DFDen	Prob > F
2	O'Brien[.5]	0,8220	3	8	0,5175
	Brown-Forsythe	0,4583	3	8	0,7189
	Levene	0,7471	3	8	0,5538
	Bartlett	0,4808	3		0,6956
8	O'Brien[.5]	0,0628	3	8	0,9780
	Brown-Forsythe	0,0333	3	8	0,9912
	Levene	0,0190	3	8	0,9961
	Bartlett	0,0270	3		0,9940
16	O'Brien[.5]	0,7137	3	8	0,5708
	Brown-Forsythe	0,6061	3	8	0,6294
	Levene	0,7895	3	8	0,5329
	Bartlett	0,6200	3		0,6019
30	O'Brien[.5]	0,8749	3	8	0,4934
	Brown-Forsythe	0,9222	3	8	0,4728
	Levene	1,3333	3	8	0,3300
	Bartlett	1,0547	3		0,3670
65	O'Brien[.5]	0,1201	3	8	0,9457
	Brown-Forsythe	0,0407	3	8	0,9882
	Levene	0,1692	3	8	0,9142
	Bartlett	0,0602	3		0,9807
98	O'Brien[.5]	0,4766	3	8	0,7073
	Brown-Forsythe	0,4242	3	8	0,7409
	Levene	0,5156	3	8	0,6830
	Bartlett	0,4660	3		0,7060
120	O'Brien[.5]	0,2068	3	8	0,8889
	Brown-Forsythe	0,1131	3	8	0,9500
	Levene	0,1619	3	8	0,9190
	Bartlett	0,0975	3		0,9615
150	O'Brien[.5]	0,2922	3	8	0,8300
	Brown-Forsythe	0,1481	3	8	0,9280
	Levene	0,3294	3	8	0,8045
	Bartlett	0,1810	3		0,9093
365	O'Brien[.5]	0,0671	3	8	0,9759
	Brown-Forsythe	0,0267	3	8	0,9936
	Levene	0,1139	3	8	0,9495
	Bartlett	0,0324	3		0,9922



БИОГРАФИЈА

Марија С. Тасић (р. Стевановић), рођена је 06.11.1991. године у Лесковцу. Основну школу „Десанка Максимовић“ завршила је у Грделици, а средњу Медицинску школу завршила је у Лесковцу. Школске 2010/2011. године уписала је Технолошки факултет у Лесковцу, студијски програм Хемијске технологије, смер Еколошко инжењерство. Основне академске студије је завршила са просечном оценом 8,02 и стекла стручни назив Дипломирани инжењер технологије. На истом факултету уписала је мастер академске студије школске 2014/15. године на смеру Еколошко инжењерство. Положила је све испите предвиђене наставним планом са просечном оценом 9,40. Дипломски - мастер рад под називом „Примена нано СаО као катализатора у синтези биодизела“ одбранила је са оценом 10 и стекла академски назив Мастер инжењер технологије. По завршетку мастер академских студија уписала је докторске студије на истом факултету, студијски програм Технолошко инжењерство, школске 2015/2016. године. Успешно је положила све испите предвиђене планом и програмом докторских студија просечном оценом 9,1. У периоду 2016-2020 на основу одлуке Министарства просвете, науке и технолошког развоја стекла је статус Стипендисте Министарства и као Стипендиста је ангажована на извођењу вежби на основним и мастер академским студијама 2017/2018 и 2019/2020 године на предметима Инструментална анализа, Текстилна влакна, Влакна специјалне намене, Хемијска текстилна технологија, Одржавање и нега текстила, Структура и својства влакана, Теорија бојења текстила и Теорија дораде текстила. Од 2023. године стиче назив истраживач сарадник и ангажована је у Иновационом центру Универзитета у Нишу. Добитник је награде за освојено треће место на учешћу на скупу међународног значаја „2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy, GREEN CIRC 2025“, одржаног у Скопљу, и за најбољу постер презентацију на учешћу на скупу међународног значаја „3rd European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (3-EuSPMF)“, одржаног у Београду.



БИБЛИОГРАФИЈА

Рад у часопису интернационалног значаја M23

1. **Marija Stevanović**, Lj. Stanojević, B. Danilović, S. Stojanović, S. Najman, M. Cakić, D. Cvetković, Aqueous extract of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves as a stabilizing agent in the synthesis of bio-active silver nanoparticles, *Hemijska Industrija*, 74 (2021) 365 – 376.
2. **Marija S. Tasić**, Jelena B. Zvezdanović, Ljiljana P. Stanojević, Jelena S. Stanojević, Sanja M. Petrović, Bojana Danilović, Dragan J. Cvetković, Synthesis, characterization and biological activity of gold nanoparticles stabilized by aqueous extracts of wild blackberry (*Rubus spp.*) leaves, *Colloid Journal*, (2024), pp. 1 – 15.
3. **Marija S. Tasić**, Jelena B. Zvezdanović, Ljiljana P. Stanojević, Jelena S. Stanojević, Sanja M. Petrović, Bojana Danilović, Dragan J. Cvetković, Characterization and biological activity of silver nanoparticles stabilized by aqueous extracts of *Rubus spp.* leaves, *Colloid Journal*, 88(1) (2026) 68 – 79.
4. **Tasić M.S.**, Petrović S.M., Simonović N.M., Pavlović D.R., Milenković A.N., Stanojević Lj.P., Cvetković D.J., Stability, bioactivity and sun protective potential of hydrogels based on silver nanoparticles stabilized by aqueous extracts of blackberry (*Rubus spp.*) leaves, *Nanobiotechnology Reports*, 21(2) (2026), 219 – 242.

Рад у часопису националног значаја M24

5. **Marija S. Stevanović**, Jelena B. Zvezdanović, Ljiljana P. Stanojević, Jelena S. Stanojević, Sanja M. Petrović, Milorad D. Cakić, Dragan J. Cvetković, Synthesis, characterization and antioxidant activity of silver nanoparticles stabilized by aqueous extracts of wild blackberry (*Rubus spp.*) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves, *Advanced Technologies*, 8(1) (2019) 47 – 58.

Саопштења са скупа међународног значаја штампана у целини M33

6. **Marija Tasić**, Milica Petković, Sofija Miljković, Žarko Vranjanac, Application of the Serbian water quality index in the assessment of the Jerma, Gaberska River, and Great Timok (2019 – 2023), International Scientific and Professional Conference



POLITEHNIKA 2025, Conference Proceedings, pp. 283 – 288, ISBN 978-86-7498-146-7, The Academy of Applied Studies Polytechnic, 28. November, 2025, Belgrade, Serbia

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу М34

7. **M. Stevanović**, J. Stanojević, J. Zvezdanović, S. Petrović, Lj. Stanojević, D. Cvetković, Antioxidant activity of quercetin in azo-initiated lipid peroxidation monitored by HPLC method, V International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry, Tehnološki fakultet, Zvornik, Univerzitet Istočno Sarajevo, pp. 612 – 612, ISBN: 978-99955-81-22-0, Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, 15. – 17. Mar, 2017.
8. D. Cvetković, LJ. Stanojević, J. Zvezdanović, J. Stanojević, S. Petrović, **M. Stevanović**, The Composition of Photosynthetic Pigments in Red Autumn Foliage of Aronia, 12th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Book of Abstracts, pp. 45 – 45, ISBN: 978-86-89429-22-0, Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš, Serbia, 20. – 21. Oct, 2017.
9. **Marija Stevanović**, Dragan Cvetković, Ljiljana Stanojević, Bojana Danilović, Jelena Zvezdanović, Sanja Petrović, Jelena Stanojević, Milorad Cakić, Synthesis and biological activities of silver nanoparticles stabilized by aqueous extract from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves, International Scientific Conference GREDIT'2018, Book of Abstracts, pp. 62 – 62, ISBN: 978-608-4624-27-1, Skopje, 22. – 25. Mar, 2018.
10. Dragan Cvetković, **Marija Stevanović**, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, Sanja Petrović, Antioxidant activity of aqueous extract from raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves estimated by DPPH test, Book of abstracts of 25th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Society of Chemists and Technologists of Macedonia, pp. 206 – 206, ISBN: 978-9989-760-16-7, Ohrid, Makedonija, 19. – 22. Sep, 2018.
11. Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, **Marija Stevanović**, Determination of capsaicin content and antioxidant activity of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds ethanolic extract, Book of abstracts, 25th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, pp. 204 – 204, Ohrid, 19. – 22. Sep, 2018.



12. **Marija Stevanović**, Ljiljana Stanojević, Dragan Cvetković, Antioxidant activity of aqueous extract from blackberry (*Rubus spp.*) leaves estimated by DPPH test, 1 st scientific-professional conference "Congress of Technological Faculties", Faculty of Technology in Banja Luka, University of Banja Luka, ISBN 978-99938-54-71-5, 11. – 13. Oct., 2018.
13. **Marija Stevanović**, Jelena Zvezdanović, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Sanja Petrović, Milorad Cakić, Dragan Cvetković, Synthesis and stabilization of silver nanoparticles by biomolecules from aqueous extracts of raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves, 13 th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Book of Abstracts, p. 74, ISBN 978-86-89429-35-0, Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš, Serbia, 18. – 19. Oct, 2019.
14. **Marija Stevanović**, Sanja Stojanović, Stevo Najman, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Synthesis and anticancer activity of silver nanoparticles stabilized by aqueous extract from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves, The 4rd International conference „Gredit2022“, Book of Abstracts, pp. 159 – 159, ISBN: 978-608-4624-34-9, Skopje, 5. – 8. May, 2022.
15. **Marija Stevanović**, Sanja Petrović, Bojana Danilović, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Stability and bio-activity of hydrogels based on silver nanoparticles stabilized by aqueous extracts of wild blackberry (*Rubus spp.*) leaves, "XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska", Book of Abstracts, pp. 55 – 55, ISBN: 978-99938-54-96-8, Faculty of Technology in Banja Luka, University of Banja Luka, Republic of Srpska, 21. – 22. Oct., 2022.
16. **Marija Stevanović**, Bojana Danilović, Sanja Petrović, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Synthesis and biological activity of gold nanoparticles stabilized by aqueous extracts of wild blackberry (*Rubus spp.*) leaves, 15th International Symposium „Novel Technologies and Sustainable Development“, Book of Abstracts, p. 68, ISBN-978-86-89429-56-5, Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš, Serbia, 20. – 21. Oct, 2023.
17. **Marija Tasić**, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Sanja Petrović, Dragan Cvetković, Physicochemical characterization of gold nanoparticles biosynthesized using *Rubus spp.* leaves extract, 1st Conference for Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy, GREEN



- CIRC 2024, Book of Abstracts, p. 28, ISBN-978-9989-650-11-6, Faculty of Technology and Metallurgy, University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, 22. – 23. April, 2024, Skopje, North Macedonia.
18. Filip S. Jovanović, **Marija S. Tasić**, Dragan J. Cvetković, Saša R. Savić, Jelena B. Zvezdanović, Sanja M. Petrović, *Hypericum perforatum* L. – Mediated green synthesis of silver nanoparticles, 1st Conference for Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy, GREEN CIRC 2024, Book of Abstracts, p. 29, ISBN-978-9989-650-11-6, Faculty of Technology and Metallurgy, University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, 22. – 23. April, 2024, Skopje, North Macedonia.
19. **Marija Tasić**, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Sanja Petrović, Goran Nikolić, Dragan Cvetković, Characterization of green-method synthesized gold nanoparticles using aqueous extracts of *Rubus spp.* leaves, 8 th International Scientific Conference “June 5th – World Environment Day”, Book of Abstracts, p. 60, ISSN 2303-5889, Biotechnical and Technical Faculty, University of Bihać, 5. – 7. June, 2024, Bihać, Bosnia and Herzegovina.
20. **Marija Tasić**, Dragan Cvetković, Environmental method of gold nanoparticles synthesis and their characterization, Student section of the 31st International Conference Ecological Truth and Environmental Research – EcoTER’24, Book of Abstracts, p. 739, ISBN 978-86-6305-152-2, Technical Faculty in Bor, University of Belgrade, 18. – 21. June, 2024, Sokobanja, Serbia.
21. **Marija Tasić**, Jelena Zvezdanović, Ljiljana Stanojević, Jelena S. Stanojević, Sanja M. Petrović, Dragan J. Cvetković, Characterization of silver nanoparticles biosynthesized by aqueous extracts *Rubus spp.* leaves, 27th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, p. 77, ISBN 978-9989-760-20-4, Metropol Lake Resort Ohrid, 25 – 28 September, 2024, Ohrid, North Macedonia.
22. Jelena Stanojević, Tamara Milosavljević, **Marija Tasić**, Nataša Simonović, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Chemical composition and antioxidant activity of hydrodistillation wastewater from *Herniariae Herba* (*Herniaria Glabra* L.), 27th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, p. 137, ISBN 978-9989-760-20-4, Metropol Lake Resort Ohrid, 25 – 28 September, 2024, Ohrid, North Macedonia.



23. **Marija Tasić**, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Sanja Petrović, Dragan Cvetković, Green synthesized silver nanoparticles characterized by XRD and EDX analysis, 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy, GREEN CIRC 2025, Book of Abstracts, p. 32, ISBN 978-9989-650-41-3, Faculty of Technology and Metallurgy, University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, 22. – 25. April, 2025, Skopje, North Macedonia
24. **Marija Tasić**, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Sanja Petrović, Dragan Cvetković, Blackberry extract as a stabilizing agent in the synthesis of silver nanoparticles, 3rd European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (3-EuSPMF), Book of Abstracts, p. 95, ISBN 978-86-7834-453-4, 1 – 4. July, 2025, Belgrade, SERBIA.
25. Aleksandra Milenković, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Ljubiša Nikolić, Jelena Stanojević, **Marija Tasić**, Ljiljana Stanojević, The characterization of piperine and its inclusion complex with β -cyclodextrin using DSC analysis, 3rd European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (3-EuSPMF), Book of Abstracts, p. 96, ISBN 978-86-7834-453-4, 1 – 4. July, 2025, Belgrade, SERBIA.
26. **Marija Tasić**, Jelena Zvezdanović, Ljiljana Stanojević, Dragan Pavlović, Sanja Petrović, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, *In vitro* testing of hydrogels formulated using biosynthesized silver nanoparticles, XVI International symposium “Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 81, ISBN 978-86-89429-60-2, 17 – 18. October, 2025, Leskovac, Serbia.

Саопштења са скупа међународног значаја штампана у М64

27. **Marija Tasić**, Jelena Zvezdanović, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Sanja Petrović, Bojana Danilović, Dragan Cvetković, Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized by aqueous extract of blackberry leaves, 15th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, SFSES, Book of Abstracts, p. 158, ISBN 978-86-6275-176-8, Science Technology Park, 23 – 25. May, 2025, Niš, Serbia

Нови технолошки поступак М83



28. **M. Stevanović**, D. Cvetković. Lj. Stanojević, J. Zvezdanović, S. Petrović, J. Stanojević, Sinteza nanočestica srebra stabilizovanih vodenim ekstraktom lista gajene jagode (*Fragaria* x *Ananassa* Duch.), Novi tehnološki postupak, 2017.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**НАНОЧЕСТИЦЕ СРЕБРА И ЗЛАТА СТАБИЛИЗОВАНЕ БИЉНИМ
ЕКСТРАКТИМА КАО ОСНОВА ЗА ИЗРАДУ ТОПИКАЛНИХ ХИДРОГЕЛОВА**

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Марија, С., Тасић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације

**НАНОЧЕСТИЦЕ СРЕБРА И ЗЛАТА СТАБИЛИЗОВАНЕ БИЉНИМ
ЕКСТРАКТИМА КАО ОСНОВА ЗА ИЗРАДУ ТОПИКАЛНИХ ХИДРОГЕЛОВА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Марија, С., Тасић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

НАНОЧЕСТИЦЕ СРЕБРА И ЗЛАТА СТАБИЛИЗОВАНЕ БИЉНИМ ЕКСТРАКТИМА КАО ОСНОВА ЗА ИЗРАДУ ТОПИКАЛНИХ ХИДРОГЕЛОВА

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**

2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**

5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**

6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Марија, С., Тасић