

JOVANA S. JOVAŠEVIĆ<sup>1</sup>  
MAJA M. MIČIĆ<sup>2</sup>  
EDIN H. SULJOVRUJIĆ<sup>2</sup>  
JOVANKA M. FILIPOVIĆ<sup>1</sup>  
SUZANA I. DIMITRIJEVIĆ<sup>1</sup>  
SIMONIDA LJ. TOMIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tehnološko-metalurški fakultet,  
Univerzitet u Beogradu,  
Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Institut za nuklearne nauke  
"Vinča", Beograd, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 544.777:544.432:615.282

DOI: 10.2298/HEMIND091221030J

## ANTIMIKROBNA AKTIVNOST HIBRIDNIH HIDROGELOVA NA BAZI POLI(VINILPIRO- LIDONA) KOJI SADRŽE SREBRO\*

*U radu je prikazana sinteza niza hibridnih hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata, itakonske kiseline i poli(vinilpirolidona) u koje su ugrađene čestice srebra, s ciljem primene ovih sistema u biomedicinske svrhe. Određene su strukturne karakteristike hidrogelova. Bubenja gelova je izvedeno u in vitro uslovima i pokazana je zavisnost stepena bubenja od temperature i udela PVP. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti hidrogelova je izvedeno korišćenjem mikrobnih kultura *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*. Najveću osetljivost nakon izlaganja uzorcima pokazuje patogeni kvasac *C. albicans*, a najmanju bakterija *E. coli*. Može se izvesti zaključak da su svi sintetisani hibridni hidrogelovi pokazali povoljna difuziona svojstva u in vitro uslovima, kao i da antimikrobna aktivnost zavisi od vrste hidrogela i soja mikroba, i vremena izlaganja hidrogelova testiranim mikrobima.*

Polimerni hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata predstavljaju slabo umrežene polimerne sisteme koji imaju sposobnost da bubre i apsorbuju vodu i biološke fluide [1–3]. U nabubrelom stanju oni pokazuju svojstva slična živim tkivima, odnosno poseduju izuzetnu biokompatibilnost. Hidrogelovi spadaju u grupu polimernih biomaterijala koji imaju značajnu primenu u farmaciji i medicini, u sistemima za kontrolisano otpuštanje terapijski aktivnih agenasa, za regeneraciju i rekonstrukciju tkiva i organa, kao veštački implantati i sl. Ugradnja implanata je praćena pojavom različitih infekcija izazvanih mikrobima [4]. Da bi se sprečila ova pojava, u matrice se ugrađuju antimikrobni agensi, s ciljem da se ostvari antimikrobna aktivnost gelova u određeno vremenskom periodu [5–7].

U radu su ispitivani struktura, bubenje i antimikrobna svojstva hibridnih hidrogelova na bazi 2-hidroksietil-metakrilata (HEMA), itakonske kiseline (IK), poli(vinil pirolidona) (PVP) i čestica srebra (Ag/P(HEMA/IK)/PVP), sintetisanih radikalnom polimerizacijom. Strukturne karakteristike gelova su određene infracrvenom spektroskopijom sa Fourier transformacijom. Studija bubenja Ag/P(HEMA/IK)/PVP gelova je izvedena u *in vitro* uslovima, u temperaturnom opsegu 25–55 °C. Antimikrobna svojstva Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridnih hidrogelova su testirana u interakciji sa mikrobnim kulturama *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*.

### EKSPERIMENTALNI DEO

#### Materijali

Za sintezu hidrogelova su korišćeni reaktanti 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), itakonska kiselina (IK),

poli(vinil pirolidon) (PVP,  $M_n$  360000), srebro-nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), kalijum persulfat (KPS) i  $N,N,N',N'$ -tetrametiletilen diamin (TEMED), a kao rastvarači su korišćeni demineralizovana voda i etanol. Strukturne formule monomera i polimera za sintezu gelova su date na šemi 1.

#### Sinteza hidrogelova

Sinteza hidrogelova je izvedena polimerizacijom preko slobodnih radikala na povišenoj temperaturi. U vodeni rastvor monomera i polimera su dodati inicijator, aktivator i umreživač, kao i rastvor  $\text{AgNO}_3$  i biološki agens kao redukciono sredstvo. Izvedeno je hemijsko umrežavanje 2-hidroksietil-metakrilata i itakonske kiseline u prisustvu interpenetranta poli(vinil pirolidona), pri čemu su varirani udeli PVP (2,0, 5,0 i 10 mol%). Reakciona smeša je pre polimerizacije degazirana, izlivena između dve staklene ploče oivičene PVC crevom. Sveže sintetisani hidrogelovi su isečeni u obliku diskova i ostavljeni da bubre u demineralizovanoj vodi u periodu od sedam dana, da bi se uklonile neproreagovale materije. Posle bubenja, diskovi su vađeni i sušeni na vazduhu, da bi se dobili suvi gelovi koji su karakterisani.

#### Studija bubenja

Studija bubenja se izvodi tako što se diskovi suvih gelova urone u puferski rastvor i proces bubenja se prati gravimetrijski, do postizanja ravnoteže na određenoj temperaturi. Dinamičko bubenje je praćeno *in vitro*, u puferu pH 7,40, na temperaturama: 25, 37, 45 i 55 °C.

#### Test antimikrobne aktivnosti

Određivanje antimikrobne aktivnosti hibridnih hidrogelova vršeno je određivanjem stepena redukcije broja bakterija u fiziološkom rastvoru u kome su bakterijske ćelije bile izložene sterilisanim uzorcima hidrogelova (sterilizacija UV zracima). Mikrobne kulture korišćenje za ova ispitivanja su bile:

– *Escherichia coli*, ATCC25922, Gram-negativna bakterija,

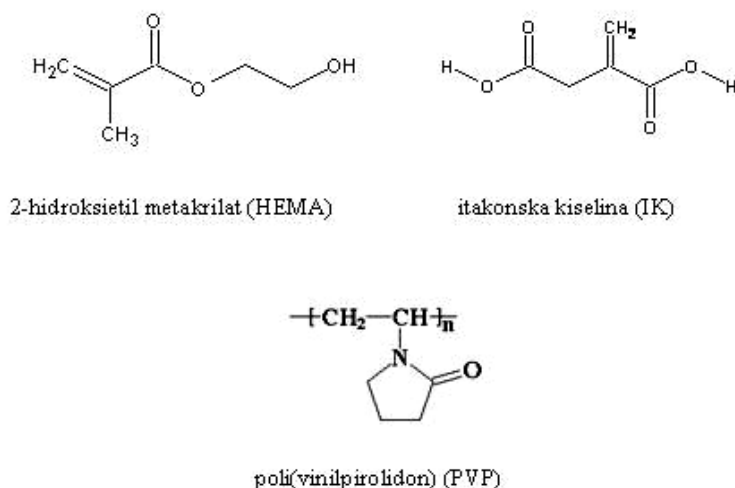
\*Rad saopšten na skupu „Osmo konferencija mladih istraživača“, Beograd, 21–23. decembar 2009.

Autor za prepisku: S.Lj. Tomić, Tehnološko-metalurški fakultet, Karneگیjeva 4/V, Beograd, Srbija.

E-pošta: simonida@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 21. decembar 2009.

Rad prihvaćen: 8. februar 2010.



Šema 1. Hemijska struktura komponenata korišćenih za sintezu hidrogelova.  
Scheme 1. Chemical structure of components used for hydrogel synthesis.

– *Staphylococcus aureus*, ATCC2593, Gram-pozitivna bakterija i

– *Candida albicans*, ATCC24433, patogeni kvasac.

U epruvete sa 9 ml sterilnog fiziološkog rastvora dodato je po 1 ml suspenzije mikroorganizama, a zatim su dodati ispitivani sterilisani uzorci hidrogelova. Nakon vorteksiranja radi homogenizacije suspenzije i postizanja kontakta sa hidrogelovima, epruvete su inkubirane na 37 °C u termostatu. Nakon 24 h inkubacije izvedeno je brojanje izraslih kolonija. Na osnovu dobijenog broja kolonija izračunat je stepen redukcije broja bakterija pod uticajem hidrogelova, korišćenjem formule:

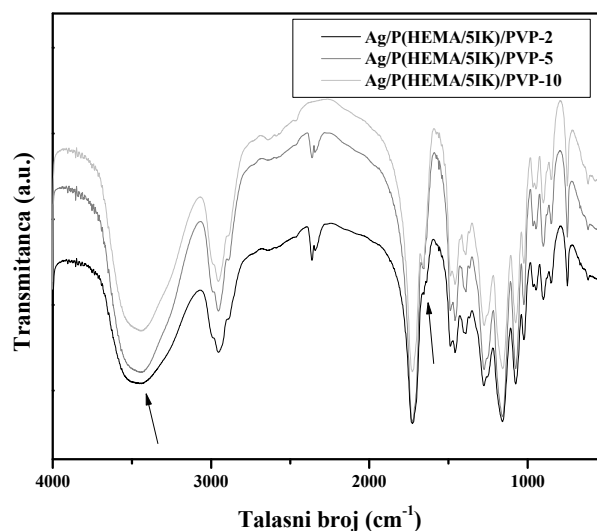
$$\% \text{ Redukcije} = 100((C_{\text{kontrola}} - C_{\text{uzorak}})/C_{\text{kontrola}}) \quad (1)$$

gde oznaka  $C_{\text{kontrola}}$  označava broj izraslih kolonija iz rastvora sa kontrolnim uzorkom, a  $C_{\text{uzorak}}$  broj izraslih kolonija iz rastvora sa ispitivanim uzorkom.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Strukturna karakterizacija hibridnih hidrogelova

Da bi se identifikovale najvažnije funkcionalne grupe koje sadrže sintetisani hibridni kopolimerni gelovi snimljeni su FTIR spektri. Na slici 1 su prikazani FTIR spektri Ag/P(HEMA/IK)/PVP hidrogelova. Srebro ugrađeno u hidrogelne matrice može da stvara interakcije sa COO– grupama iz IK i O atomom iz PVP, što dovodi do pomeranja pikova karakterističnih za PVP (traka na 1660  $\text{cm}^{-1}$ ) i pika za karboksilnu grupu (traka na 1723  $\text{cm}^{-1}$ ), i u zavisnost od količine vezanog srebra, pikovi se proporcionalno pomeraju i imaju promenjen intenzitet [8]. Srebro u hidrogelovima utiče na stepen bubrenja, tako da se veličina pika koji ukazuje na povećanu hidrofilitnost menja (traka na 3476  $\text{cm}^{-1}$ ). Ostali karakteristični pikovi potiču od C–C i C–H veza u polimetakrilatnom osnovnom lancu [9].



Slika 1. FTIR spektri Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridnih gelova.  
Figure 1. FTIR spectra of Ag/P(HEMA/IA)/PVP hybrid gels.

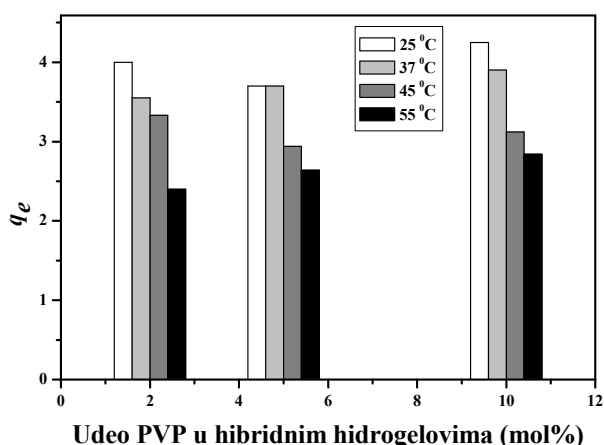
### Studija bubrenja hibridnih gelova

Hemijskim umrežavanjem (radikalna polimerizacija) sintetisani su hibridni hidrogelovi koji sadrže četiri komponente: HEMA, IK, PVP i čestice srebra. Praćeno je bubrenje gelova sa različitim udelima PVP (2, 5 i 10 mol%) u puferu pH 7,40 u opsegu temperatura (25, 37, 45 i 55 °C), da bi se ispitalo ponašanje gelova u *in vitro* uslovima. Odabrana vrednost pufera je 7,40, koja odgovara pH vrednosti bioloških fluida: humoralnog i sinovijalnog fluida, kao i pH kože i nazalnog tkiva. Temperatura od 37 °C je normalna fiziološka temperatura ljudskog tela, a temperatura od 25 °C je sobna temperatura i radi poređenja je praćeno bubrenje gelova i na toj temperaturi. Pošto je iz literature poznato da PHEMA pokazuje minimalnu vrednost stepena bubrenja oko 55 °C [10], proces bubrenja je praćen i na temperaturama u bli-

zini ove temperature. Interpenetrant PVP ( $M_n$  360000) u sintezi gelova je izabran da bi se poboljšala hidrofilnost i dobila specifična antimikrobna svojstva sa produženim delovanjem, što je dodatno potencirano ugradnjom čestica srebra.

U hibridnim hidrogelovima Ag/P(HEMA/IK)/PVP pored postojećeg hemijskog umreženja, javlja se i fizičko umreženje uspostavljanjem vodoničnih veza (koje grade kiseonik iz karbonilne grupe PVP i vodonik iz OH grupe HEMA) između polimernih lanaca. Na pH 7,40 obe karboksilne grupe IK su disosovane i povećan je intermolekulski prostor između polimernih lanaca usled odbijanja istoimenog naelektrisanja  $\text{COO}^-$  grupa, kao i stepen bubrenja.

Bubrenje hibridnih hidrogelova koji sadrže različite udele PVP 2, 5 i 10 mol%, u puferu pH 7,40 u temperaturnom opsegu 25-55 °C, prikazano je na slici 2. Iz dijagrama zavisnosti ravnotežnog stepena bubrenja,  $q_e$ , od udela PVP na ispitivanim temperaturama uočava se tendencija ponašanja Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridnih hidrogelova u funkciji ova dva parametra. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja,  $q_e$ , za Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridne hidrogelove su u opsegu od 2,46 do 4,25.



Slika 2. Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja,  $q_e$ , od udela PVP i temperature za Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridne hidrogelove.

Figure 2. Dependence of  $q_e$  on PVP fraction and temperature for Ag/P(HEMA/IA)/PVP hybrid hydrogels.

Ukoliko se posmatra uticaj sadržaja PVP u gelovima i temperature na ravnotežni stepen bubrenja,  $q_e$ , može se zaključiti da  $q_e$  uglavnom raste sa povećanjem sadržaja PVP, usled povećane hidrofilnosti uzoraka. Sa porastom temperature dolazi do smanjenja stepena bubrenja jer preovlađuje uticaj 2-hidroksietil-metakrilata, za koji je utvrđeno da ima minimum bubrenja na oko 55 °C [10].

Mehanizam transporta fluida se određuje iz opšte poluempirijske jednačine (2) koja daje kinetičke para-

metre bubrenja hidrogelova, pri čemu se uzima u obzir prvi deo krive bubrenja ( $M_t/M_\infty < 0.6$ ):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \left( \frac{Dt}{l^2} \right)^{1/2} \quad (3)$$

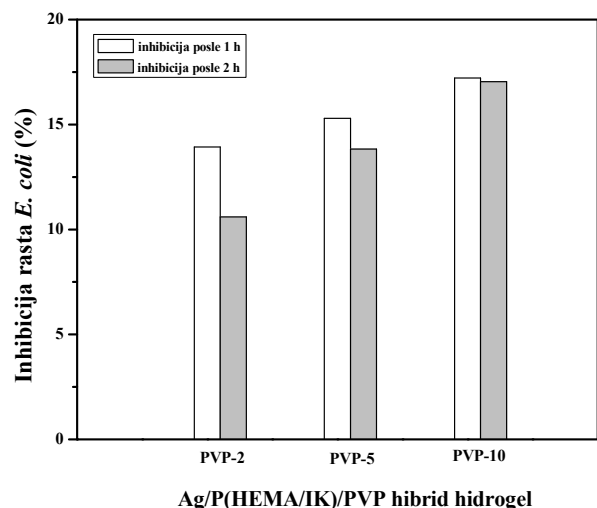
Kinetika bubrenja zavisi od difuzije fluida u hidrogelovima i od relaksacije polimernih lanaca. Za hidrogelove u obliku diska, vrednost difuzionog eksponenta bubrenja  $n \approx 0,50$  ukazuje da se radi o Fick-ovoj difuziji [11]. Fick-ov zakon se može primeniti kada difuzija upravlja procesom bubrenja. Ako je  $n = 1$  bubrenje se odvija usled relaksacije polimernih lanaca. Za vrednosti  $n$  između 0,5 i 1,0, mehanizam transporta fluida je ne-Fick-ov jer i difuzija i relaksacija lanaca kontrolišu ukupnu brzinu transporta fluida. Na osnovu jednačina (2) i (3) određeni su kinetički parametri bubrenja hidrogelova kinetička konstanta bubrenja,  $k$ , difuzioni eksponent bubrenja,  $n$  i koeficijent difuzije fluida,  $D$ .

Mehanizam transporta fluida pokazuje da svi Ag/P(HEMA/IK)/PVP gelovi na svim temperaturama pokazuju Fick-ovu difuziju. Koeficijent difuzije,  $D$  (jednačina (3)), za hidrogelove se računa iz kinetičkih podataka dobijenih praćenjem procesa bubrenja hidrogelova (jednačina (2)), odnosno iz vrednosti kinetičke konstante bubrenja,  $k$ . Vrednosti  $D$  hidrogelova Ag/P(HEMA/IK)/PVP kreću se u opsegu  $0,189 \times 10^{-7}$ – $4,48 \times 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ . Vrednosti koeficijenta difuzije rastu sa povećanjem temperature za sve uzorke. Najveća vrednost koeficijenta difuzije je na 55 °C kod Ag/P(HEMA/IK)/PVP-5, dok najmanju vrednost pokazuje uzorak Ag/P(HEMA/IK)/PVP-2 na 25 °C.

#### Antimikrobna svojstva hibridnih hidrogelova

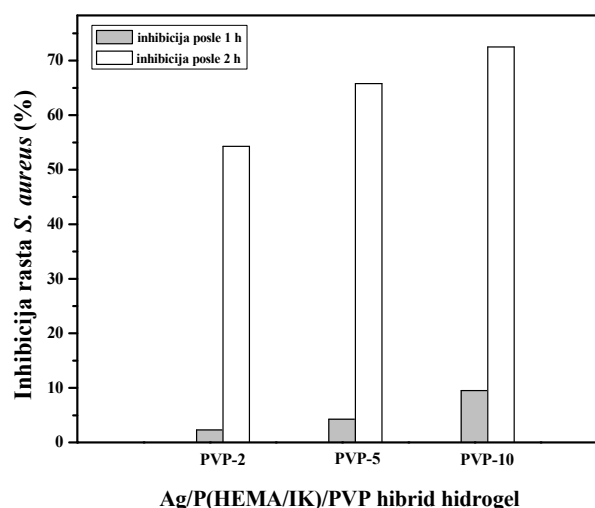
Ispitivanje antimikrobnog delovanja Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridnih hidrogelova, u *in vitro* uslovima, izvedeno je s ciljem određivanja antimikrobne efikasnosti ugrađenog srebra i PVP u gelove, tako da imamo sinergetsko dejstvo ova dva antimikrobna agensa. Na osnovu ranijih istraživanja pokazalo se da hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil-metakrilata koji sadrže srebro pokazuju odličnu antimikrobnu aktivnost [12].

Prema rezultatima prikazanim na slikama 3–5, može se uočiti da antimikrobni efekat zavisi od udela PVP u gelovima i kako raste udeo PVP, tako se povećava efikasnost. Najveća osetljivost na ispitivane gelove je dobijena za ćelije patogenog kvasca *C. albicans*, gde je postignut procenat redukcije broja za oko 80–90% (slika 5). Najmanju osetljivost na dejstvo hidrogelova je pokazala Gram negativna bakterija *E. coli* gde je postignut procenat redukcije broja ćelija između 10 i 18% (slika 3). Osetljivost Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* je veoma mala nakon jednog sata izlaganja uzorcima (slika



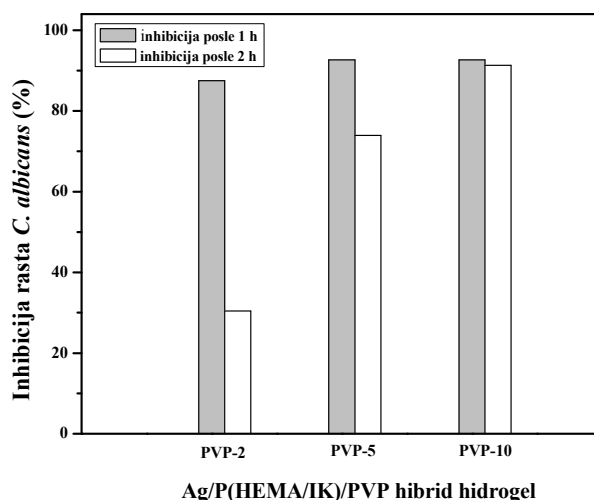
Slika 3. Antimikrobna aktivnost Ag/P(HEMA/IK)/PVP hidrogelova za *E. coli*.

Figure 3. Antimicrobial activity of Ag/P(HEMA/IA)/PVP hydrogels for *E. coli*.



Slika 4. Antimikrobna aktivnost Ag/P(HEMA/IK)/PVP hidrogelova za *S. aureus*.

Figure 4. Antimicrobial activity of Ag/P(HEMA/IA)/PVP hydrogels for *S. aureus*.



Slika 5. Antimikrobna aktivnost Ag/P(HEMA/IK)/PVP hidrogelova za *C. albicans*.

Figure 5. Antimicrobial activity of Ag/P(HEMA/IA)/PVP hydrogels for *C. albicans*.

4). Međutim, nakon drugog sata izlaganja postignuti stepen redukcije broja ćelija se kretao u opsegu od oko 50% za uzorak sa najmanjom količinom srebra i oko 70% za uzorak sa najvećim sadržajem PVP, odnosno Ag čestica. Imajući u vidu vreme delovanja uzoraka, može se uočiti da se procenat redukcija broja ćelija smanjuje sa vremenom, za sojeve *C. albicans* i *E. coli*, kod uzoraka sa manjim sadržajem PVP (manjim sadržajem Ag), jer verovatno dolazi do izmene aktivnosti otpuštenih jona srebra u rastvoru, a time i do promene osetljivosti mikroorganizama. Međutim, kod Gram pozitivne bakterije *S. aureus* se uočava obrnuta situacija, što može biti posledica različite ćelijske građe, tj. osetljivosti na koncentraciju srebra, koja se povećava sa vremenom izlaganja uzorka soju mikroba [13]. Može se zaključiti da antimikrobna aktivnost hibridnih hidrogelova

zavisi od vremena izlaganja, soja mikroorganizma i tipa gela.

## ZAKLJUČAK

U radu su sintetisani hibridni hidrogelovi kopolimera 2-hidroksietil-metakrilata i itakonske kiseline sa različitim udelima interpenetranta poli(vinil piroolidona) i ugrađenim česticama srebra, polimerizacijom preko slobodnih radikala. FTIR analiza Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridnih gelova je pokazala prisustvo traka na 1660 i 1723  $\text{cm}^{-1}$  koje ukazuju da je došlo do ugrađivanja čestica srebra u P(HEMA/IK)/PVP hidrogelove. Bubrenje Ag/P(HEMA/IK)/PVP hidrogelova zavisi od udela PVP i temperature. Ravnotežni stepeni bubrenja hidrogelova se nalaze u opsegu od 2,46–4,25. Antimikrobni efekti

sterilisanih hibridnih hidrogelova zavise od udela PVP u gelovima, i kako raste udeo PVP, tako se povećava efikasnost. Najveću osetljivost iskazanu procentom redukcije broja ćelija nakon izlaganja uzorcima pokazuje patogeni kvasac *C. albicans*, a najmanju osetljivost pokazuje bakterija *E. coli*. Kod *S. aureus* uočen je suprotan efekat, odnosno, antimikrobna aktivnost se značajno pojačava sa periodom izlaganja. Analizirajući ponašanje sintetisanih Ag/P(HEMA/IK)/PVP hibridnih hidrogelova, može se izvesti zaključak da su svi sintetisani gelovi pokazali povoljna difuziona svojstva u *in vitro* uslovi- ma, kao i zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost prema testiranim sojevima, što ih kandiduje kao potencijalne polimerne biomaterijale za primenu u medicini i farmaciji, a posebno u dermatologiji i kozmetici.

#### Zahvalnica

Ovaj rad je podržan od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (projekti No. 145072 i TR 19027).

#### LITERATURA

- [1] C.-C. Lin, K.S. Anseth, *Pharm. Res.* **26** (2009) 631–643.
- [2] N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Adv. Mater.* **18** (2006) 1345–1360.
- [3] S. Dumitriu (Ed), *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 133–147.
- [4] M. Habash, G. Reid, *J. Clin. Pharmacol.* **39** (1999) 887–898.
- [5] S. Mandal, S. Phadtare, M. Sastry, *Curr. Appl. Phys.* **5** (2005) 118–127.
- [6] P. Jain, T. Pradeep, *Biotechnol. Bioeng.* **90** (2005) 59–63.
- [7] C.W. Chou, S.H. Hsu, P.W. Wang, *J. Biomed. Mater. Res.* **84** (2008) 785–794.
- [8] S.Lj. Tomić, M.M. Mičić, D. Đokić, D.G. Vasiljević-Radović, J.M. Filipović, E.H. Suljovrujić, *Mater. Manuf. Process.* **24** (2009) 1197–1201.
- [9] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, J.C. Morrill (Eds), *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (5<sup>th</sup> ed.), John Wiley and Sons Inc., New York, 1991, p. 91.
- [10] W.-F. Lee, C.-F. Chen, *Polym. Gels Netw.* **6** (1998) 493–511.
- [11] T. Alfrey, E.F. Gurnee, W.G. Lloyd, *J. Polym. Sci. C* **12** (1966) 249–261.
- [12] M. Mičić, S. Tomić, J. Filipović, E. Suljovrujić, *Hem. Ind.* **63** (2009) 137–142.
- [13] S. Tomić, nepublikovani rezultati, 2010.

**SUMMARY****ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HYBRID HYDROGELS BASED ON POLY(VINYLPYRROLIDONE) CONTAINING SILVER**

Jovana S. Jovašević<sup>1</sup>, Maja M. Mičić<sup>2</sup>, Edin H. Suljovrujić<sup>2</sup>, Jovanka M. Filipović<sup>1</sup>, Suzana I. Dimitrijević<sup>1</sup>, Simonida Lj. Tomić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4/V, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Vinča Institute of Nuclear Sciences, 11001 Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

New hybrid hydrogels were prepared by radical copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate, itaconic acid, poly(vinylpyrrolidone) and silver salt. FTIR spectroscopy has confirmed binding of silver particles in hydrogels. Swelling studies performed in *in vitro* conditions showed dependence on PVP content and temperature. It can be seen that the antimicrobial activity of the Ag/P(HEMA/IA)PVP hybrid hydrogels depends on the PVP moiety and with the increase of PVP content the microbial contamination is more efficiently reduced. The best sensitivity was obtained for the polymers tested for antimicrobial activity against the yeast *C. albicans*, one of the most commonly encountered human pathogens, causing a wide variety of infections ranging from mucosal infections in generally healthy persons to life-threatening systemic infections in individuals with impaired immunity. A slightly less susceptible to antimicrobial effect of hydrogels was obtained for the Gram-positive bacteria *S. aureus*, where the reduction of cells was about 70% after two hours of exposure, for the sample with the highest PVP content. The least susceptible to the antimicrobial activity of hydrogels examined was the Gram-negative bacteria *E. coli*, where the percent of cell reduction was below 20%. Bearing in mind the influence of the time of exposure of microbes to the Ag/P(HEMA/IA)/PVP hybrid hydrogels, it was observed that the reduction of the number of cells depends on time, microbial culture and type of hybrid hydrogel sample. Due to their swelling and antimicrobial properties, silver/poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid)/poly(vinylpyrrolidone) hybrid hydrogels show potential to use in the field of biomedicine, especially for treatment of skin and burns in dermocosmetics.

Ključne reči: Hibridni hidrogelovi • Poli(vinilpirolidon) • Čestice srebra • Antimikrobna aktivnost  
Key words: Hybrid hydrogels • Poly(vinylpyrrolidone) • Silver particles • Antimicrobial activity