

Antimikrobne prevlake temeljene na nanočesticama metala i metalnih oksida

Čemerin, Katja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:880895>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Katja Čemerin

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Katja Čemerin

Predala je izrađen diplomski rad dana: 25. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Ernest Meštrović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Petar Kassal, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Iva Rezić, Sveučilište u Zagrebu Tekstilno-
tehnološki fakultet

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 30. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Katja Čemerin

ANTIMIKROBNE PREVLAKE TEMELJENE NA NANOČESTICAMA
METALA I METALNIH OKSIDA

DIPLOMSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Ernest Meštrović

Komentor:

Prof. dr. sc. Iva Rezić Meštrović

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Ernest Meštrović

Izv. prof. dr. sc. Petar Kassal

Prof. dr. sc. Iva Rezić Meštrović

Zagreb, rujan 2024.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću na mentorstvu, susretljivosti, uloženom trudu i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem komentorici prof. dr. sc. Ivi Rezić Meštrović na pristupačnosti, uloženom trudu, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Somogyi Škoc na uloženom trudu i vremenu pri provedbi eksperimentalnog dijela.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na pomoći, uloženom trudu i vremenu pri provedbi mikrobioloških ispitivanja.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Nikoli Bregoviću i asistentu, mag. chem. Marinu Lioviću na pomoći i prenesenim znanjima tijekom izrade eksperimentalnog dijela.

Zahvaljujem svojoj obitelji za podršku i poticaj koji su mi pružili tijekom mog obrazovanja.

Sažetak

Bakar je jedan od najpoznatijih antimikrobnih metala povezan s različitim antimikrobnim mehanizmima kao što su: permeabilizacija plazma membrane, lipidna peroksidacija membrane, izmjena proteina, inhibicija sastavljanja i aktivnosti proteina ili denaturacija nukleinskih kiselina. Nadalje, bakar u obliku nanomaterijala pokazuje veću antimikrobnu aktivnost te predstavlja novu klasu nano-antimikrobnih sredstava koja pružaju dodatne učinke i karakteristike u usporedbi s često korištenim nanočesticama srebra ili cinkovog oksida. Vlakna, pređe i drugi materijali obogaćeni nanočesticama bakra mogu se koristiti u različitim biomedicinskim i tekstilnim primjenama kao što su medicinski uređaji, zavoji za opekline ili rane, zdravstveni materijali (uključujući proizvode za jednokratnu upotrebu), proizvodi za osobnu njegu, veterinarski proizvodi, vojne i bio-obrambene stavke, zaštitna odijela ili odjeća. Ovaj rad stoga predstavlja primjenu Cu nanočestica u funkcionalizaciji površine medicinskog materijala. Biokompatibilne pređe dobivene elektropredenjem modificirane su primjenom sol-gel postupka tijekom kojeg su Cu nanočestice ugrađene u antimikrobne prevlake. Materijali su karakterizirani prije i nakon modifikacije pomoću FTIR, UV-VIS, SEM i DLS metoda. Rezultati su dokazali učinkovitu tvorbu novog antimikrobnog premaza koji je homogeno raspoređen na površini pređe. Osim toga, antimikrobni testovi Cu nanočestica dokazali su antimikrobno svojstvo Cu nanočestica u prevlakama, omogućujući buduću primjenu biopolimera kao novih medicinskih materijala.

Ključne riječi: bakar, nanočestice, sol-gel postupak, FTIR, UV-VIS, SEM i DLS

Abstract

Copper is one of the most widely recognized antimicrobial metal linked to multiple antimicrobial mechanisms such as: plasma membrane permeabilization, membrane lipid peroxidation, alteration of proteins, inhibition of protein assembly and activity, or denaturation of nucleic acids. Moreover, copper in a form of nanomaterials shows greater antimicrobial activity so is an emerging class of nano-antimicrobials providing complementary effects and characteristics, as compared to widely used silver or zinc oxide nanoparticles. Metal nanoparticle-loaded yarns can be used in a number of biomedical and textile applications such as medical devices, burn or wound dressings, healthcare materials (including disposables), personal care products, veterinary, military and bio-defense items, protective suits or clothing. This work therefore presents application of Cu nanoparticles in functionalization of the surface of medical material by deep coating method. Electrospun biocompatible yarns were modified by using sol-gel procedure during which the Cu nanoparticles were incorporated within the coating. The materials were characterized before and after the modification by FTIR, UV-VIS, SEM and DLS methods. The results proved efficient formation of a novel antimicrobial coating homogeneously distributed on the surface of the yarns. Additionally, antimicrobial tests of Cu nanoparticles proved the antimicrobial property of Cu nanoparticles in coating, enabling future application of novel medical materials.

Key words: copper, nanoparticles, sol-gel procedure, FTIR, UV-VIS, SEM, DLS

SADRŽAJ

1. Uvod	4
2. TEORIJSKI DIO	6
2.1. Nanočestice.....	7
2.2. Svojstva tvari na nanometarskoj skali.....	10
2.3. Metode i postupci za karakterizaciju nanočestica.....	14
3. Nanočestice bakra.....	17
3.1. Fizikalna i kemijska svojstva.....	18
3.2. Postupci dobivanja.....	19
3.3. Zeleni postupci dobivanja.....	21
4. Antimikrobno djelovanje.....	22
4.1. Definicija i važnost antimikrobne zaštite.....	24
4.3. Izazovi vezani uz antimikrobnu rezistenciju, utjecaj na globalno zdravlje.....	26
5. Nanočestice metala kao antimikrobne tvari.....	29
5.1. Mehanizmi djelovanja nanočestica metala na mikroorganizme.....	32
5.2. Oštećenje stanične membrane.....	33
5.3. Generiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).....	33
5.4. Inhibicija enzimskih sustava.....	34
5.5. Nanočestice u okolišu.....	34
5.6. Smjerovi istraživanja u primjeni nanočestica u medicini.....	36
6. Metode određivanja efikasnosti mikrobne zaštite.....	37
7. EKSPERIMENTALNI DIO	39
7.1. Materijali i metode.....	40
7.2. Priprema nanočestica i učvršćivanje u antimikrobnu prevlaku.....	40
7.3. Instrumentalne metode analize.....	43

7.3.1. Raman-FTIR-NMR.....	43
7.3.2. NMR.....	43
7.3.3. UV-VIS.....	44
7.3.4. DLS.....	46
7.3.5. SEM-EDX.....	47
7.4. Antimikrobna ispitivanja.....	48
8. REZULTARI I RASPRAVA.....	50
8.1. Sol.gel postupci u pripremi uzoraka.....	51
8.2. Raman, FTIR i NMR spektroskopija.....	52
8.3. UV-VIS.....	55
8.4. DLS.....	60
8.5. SEM-EDX.....	64
8.6. Antimikrobna ispitivanja.....	68
9. ZAKLJUČAK.....	72
10. LITERATURA.....	75
11. ŽIVOTOPIS.....	80

1. Uvod

Prevlake od nanočestica područje su u znanosti materijala i inženjerstvu koje se vrlo brzo razvija. Nanočestica je mala čestica veličine 1 do 100 nanometara te ih ljudsko oko ne može detektirati. Nanočestice pokazuju znatno drugačija fizikalna i kemijska svojstva od materijala većih veličina. Čestice u rasponu ovih veličina koriste se kako bi se prenijela poboljšana svojstva površinama i materijalima, a njihov visoki omjer površine i volumena dovodi do pojave novih mehaničkih, kemijskih, električnih, optičkih, magnetskih, elektrooptičkih i magneto-optičkih svojstava.

Razvoj i implementacija prevlaka od nanočestica aktivno je područje istraživanja s primjenama koje obuhvaćaju sektore kao što su elektrotehnika, energija, zrakoplovstvo, automobilska industrija, zdravstvo te proizvodnja. S napretkom znanosti i proizvodnje nanomaterijala, potencijal prevlaka od nanočesticama spreman je značajno rasti u nadolazećim godinama. Neke od prednosti prevlaka od nanočestica su bolji izgled površina, dobra kemijska otpornost, smanjena propusnost za korozivnu okolinu te time i bolja korozijska svojstva, prilagođena optička svojstva, toplinska stabilnost, zaštita od klizanja, zamaglivanja i obraštanja, antirefleksna priroda, otpornost na ogrebotine, lako čišćenje površine te dobro prijanjanje na različite materijale. Premazi od nanočestica imaju široku primjenu te se mogu nanositi na metale, keramiku, polimere i tekstil. Izvor nanomaterijala mogu biti metalni i nemetalni materijali. Dok nemetalni nanomaterijali uključuju polimerne nanočestice, nanočestice na bazi silicijevog dioksida i nanočestice na bazi ugljika, metalni nanomaterijali uključuju zlato, srebro, bakar, aluminijev oksid, cinkov oksid, željezov oksid i titanijev oksid.

Sve je veća pojava otpornosti mikroorganizama na višestruke antibiotike ili dezinfekcijska sredstva, stoga se ulaže u razvoj novih i učinkovitih sredstava u borbi protiv patogenih mikroorganizama. Istraživanja pokazuju da nanočestice na bazi metala posjeduju određene mehanizme toksičnosti protiv bakterija. Ova karakteristika ne samo da otežava bakterijama da razviju otpornost već i proširuje spektar antibakterijskog djelovanja. Zbog svoje male veličine, nanočestice mogu prodrijeti u kroz staničnu stijenku i membranu

bakterija ometati njihove važne životne funkcije te na taj način inhibirati njihov daljni razvoj.

Nanočestice bakra važna su vrsta anorganskih nanočestica sa širokim rasponom primjene. Upotreba bakra je globalno raširena zbog njegove svestranosti i antimikrobnog djelovanja. Nanomaterijali na bazi bakra mogu se primijeniti u poljoprivredi, stočarstvu, obradi vode, zaštiti drva i proizvodnji tekstila. Osim toga, bakreni nanomaterijali mogu poslužiti kao alternativa drugim nanomaterijalima plemenitih metala u pretvorbi sunčeve energije, baterijama i elektrokemijskim sensorima zbog svoje vodljive sposobnosti i nižih troškova proizvodnje. Bakar i nanočestice na bazi bakra pokazuju izvrsno antibakterijsko djelovanje stoga je cilj rada dobivanje nanočestica na bazi bakra te njihovo nanošenje na materijale u svrhu antimikrobne zaštite. U laboratoriju su nanočestice bakra pripremljene reakcijom bakrovog sulfata pentahidrata te askorbinske kiseline. Analiza čestica provedena je na UV/Vis spektrofotometru te DLS-u te im je određena antimikrobnost metodama dilucije i difuzije.

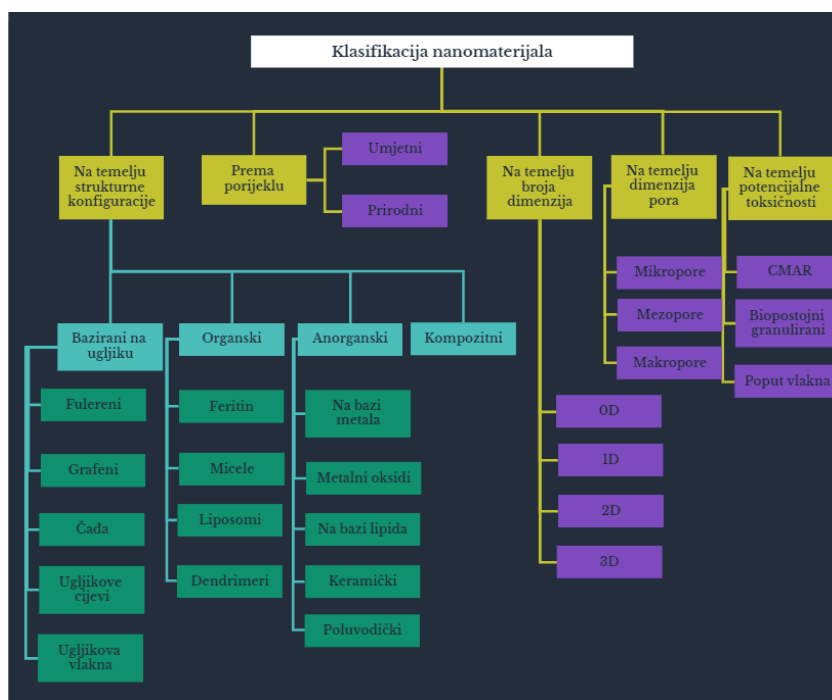
Nanočestice su zatim sol-gel metodom nanosene na površinu biorazgradivih biokompatibilnih polimera u obliku antimikrobne prevlake, nakon čega su uzorci karakterizirani Raman, FTIR-ATR, SEM metodama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nanočestice

Nanotehnologija je jedna od najperspektivnijih tehnologija 21. stoljeća. To je sposobnost da teoriju nanoznanosti korisno primijenimo promatranjem, mjerenjem, manipuliranjem, sklapanjem, kontroliranjem i proizvodnjom materije na nanometarskoj razini. *Nacionalna nanotehnološka inicijativa* (NNI) u Sjedinjenim Državama definira nanotehnologiju kao znanost, inženjerstvo i tehnologiju koja se provodi na nanoskali (1 do 100 nm), gdje jedinstveni fenomeni omogućuju nove primjene u širokom rasponu područja, od kemije, fizike i biologije, do medicine, inženjerstva i elektronike. [1]

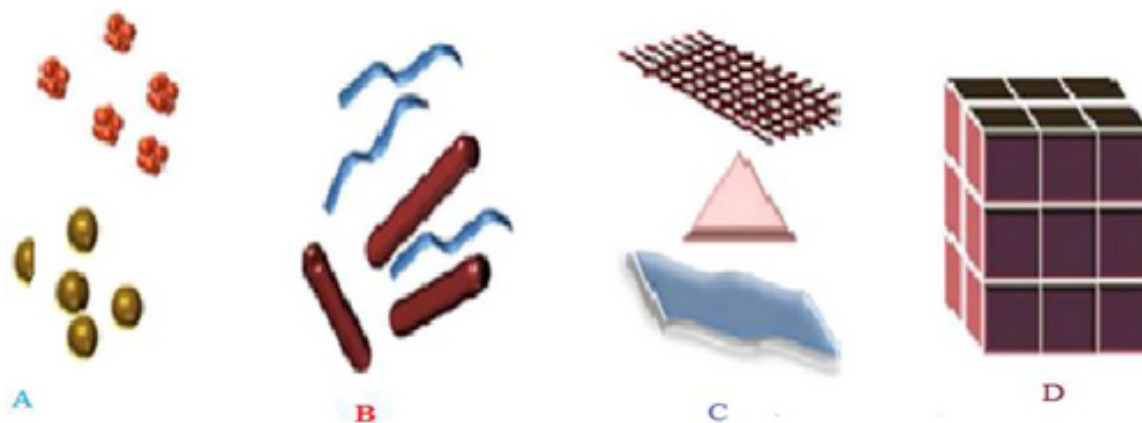
Nanočestice su mali materijali veličine od 1 do 100 nm te se općenito mogu podijeliti u različite kategorije na temelju svojih svojstava, oblika ili veličine. Koriste se u više sektora, uključujući medicinu, poljoprivredu, okoliš i elektroniku, zbog svojih jedinstvenih fizičkih, bioloških, mehaničkih, optičkih i električnih svojstava. Prema svom strukturnom sastavu, nanočestice se mogu podijeliti u četiri skupine: organske/dendrimeri, anorganske, na bazi ugljika i kompozitne (Slika 1) [2]. Na Slici 1. grafički je prikazana klasifikacija nanomaterijala.



Slika 1. Klasifikacija nanomaterija [2]

Na temelju fizičkih i kemijskih karakteristika neke od najpoznatijih nanočestica su nanočestice bazirane na ugljiku kao što su fulereni i ugljikove nanocijevi (CNT), metalne nanočestice (nanočestice alkalnih i plemenitih metala kao što su Cu, Ag, Au), keramičke nanočestice, nanočestice poluvodiča, polimerne nanočestice te nanočestice temeljene na lipidima [3].

Nanomaterijali su klasificirani u četiri tipa na temelju dimenzija veličine: 0D, 1D, 2D i 3D, kao što je prikazano na Slici 2.



Slika 2. Podjela nanomaterijala prema dimenziji: A, nulta dimenzija; B, jednodimenzionalni; C, dvodimenzionalni; D, trodimenzionalni [1]

S obzirom na njihovu strukturu nanomaterijali klasificiraju se kao konsolidirani materijali i nanodisperzije. Konsolidirani nanomaterijali dalje se klasificiraju u nekoliko skupina. Jednodimenzionalni nano disperzivni sustavi nazivaju se nanoprahovi i nanočestice. Nanočestice se dalje klasificiraju kao nanokristali, nanoklasteri, nanocijevi, supermolekule, itd. [4] Klasifikacija nanočestica omogućuje razumijevanje širokog područja primjene nanočestice u različitim područjima znanosti, uključujući prevlake temeljene na nanočesticama.

Nanočestice nisu same jednostavne molekule te se sastoje od tri sloja, tj. površinski sloj, koji može biti funkcionaliziran s malim molekulama, metalnim ionima, površinski aktivnim tvarima i polimerima, sloj ljuske, koji je kemijski različit materijal od jezgre u svim aspektima i jezgra, koja je središnji dio nanočestice i obično se odnosi na samu nanočesticu [3]. Ovisno o vanjskim uvjetima kao što su temperatura ili tlak, atomi se mogu rasporediti na

različite načine u kristalnoj rešetki što dovodi do različitih kristalnih struktura za neke materijale s istim omjerima sadržanih elemenata. Stoga, na temelju vanjskih uvjeta, jedan nanomaterijal može imati različite kristalne strukture s različitim fizikalno-kemijska svojstva kao što su reaktivnost ili fotokatalitička aktivnost. [5]

Nanočestice i strukture koristili su Rimljani još u četvrtom stoljeću te su pokazali jedan od najzanimljivijih primjera nanotehnologije u starom svijetu. Likurgova šalica (Slika 3.) iz zbirke Britanskog muzeja jedno je od najistaknutijih dostignuća u antičkoj industriji stakla. To je najstariji poznati primjerak dikroičnog stakla. Dikroično staklo opisuje dvije različite vrste stakla, koje mijenjaju boju u određenim uvjetima osvjetljenja. To znači da šalica ima dvije različite boje: staklo izgleda zeleno na izravnom svjetlu, a crveno-ljubičasto kada svjetlost prodire kroz staklo.



Slika 3. Likurgova čaša. Staklo izgleda zeleno u reflektiranoj svjetlosti (lijevo) i crveno-ljubičasto u propusnoj svjetlosti (desno) [1]

Koncept nanočestica prvi puta je predstavljen 1857. godine kada je Michael Faraday proučavao pripremu i svojstva koloidnih suspenzija "Ruby" zlata. Nanočestice zlata posjeduju jedinstvena optička i elektronska svojstva. Faraday je pokazao kako nanočestice zlata proizvode otopine različitih boja pod određenim uvjetima osvjetljenja. [1]

Koncept "nanometra" prvi je predložio Richard Zsigmondy, dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 1925. godine. Osmislio je pojam nanometar izričito za karakterizaciju veličine čestica i bio je prvi koji je pomoću mikroskopa izmjerio veličinu čestica kao što su koloidi zlata. [6]

Američki fizičar i dobitnik Nobelove nagrade Richard Feynman smatra se ocem moderne nanotehnologije. Predstavio je koncept nanotehnologije 1959. godine tijekom godišnjeg

sastanka Američkog fizikalnog društva. Feynman je održao predavanje pod naslovom "*Ima puno mjesta na dnu*" na Kalifornijskom institutu za tehnologiju (Caltech) [1] te je istaknuo mogućnost korištenja strojeva za konstruiranje manjih strojeva na molekularnoj razini [7]. Feynman je predvidio značajan napredak u znanosti kroz nanotehnologiju, posebno u medicini i znanosti o materijalima. Pretpostavio je da se maleni strojevi mogu programirati za obavljanje složenih zadataka poput popravljavanja stanica [8].

Do napretka u nanotehnologiji došlo je 1981. godine kada su Gerd Binnig i Heinrich Rohrer izumili novu vrstu mikroskopa u IBM-ovom istraživačkom laboratoriju u Zurichu, skenirajući tunelski mikroskop (STM). Godine 1986. Binnig i Rohrer dobili su Nobelovu nagradu za fiziku "*za njihov dizajn STM-a*". Ovaj izum doveo je do razvoja mikroskopa atomske sile (AFM) i mikroskopa sa skenirajućom sondom (SPM), koji su instrumenti izbora današnjih istraživača nanotehnologije. [1]

U 1980-ima i 1990-ima došlo je do brzog napretka istraživanja i razvoja u različitim područjima nanotehnologije, uključujući sintezu i karakterizaciju različitih nanočestica. Napredak u tehnikama taloženja tankog filma, kao što je kemijsko taloženje iz pare (CVD) i fizičko taloženje iz pare (PVD) [9], omogućio je izradu premaza i tankih filmova na bazi nanočestica.

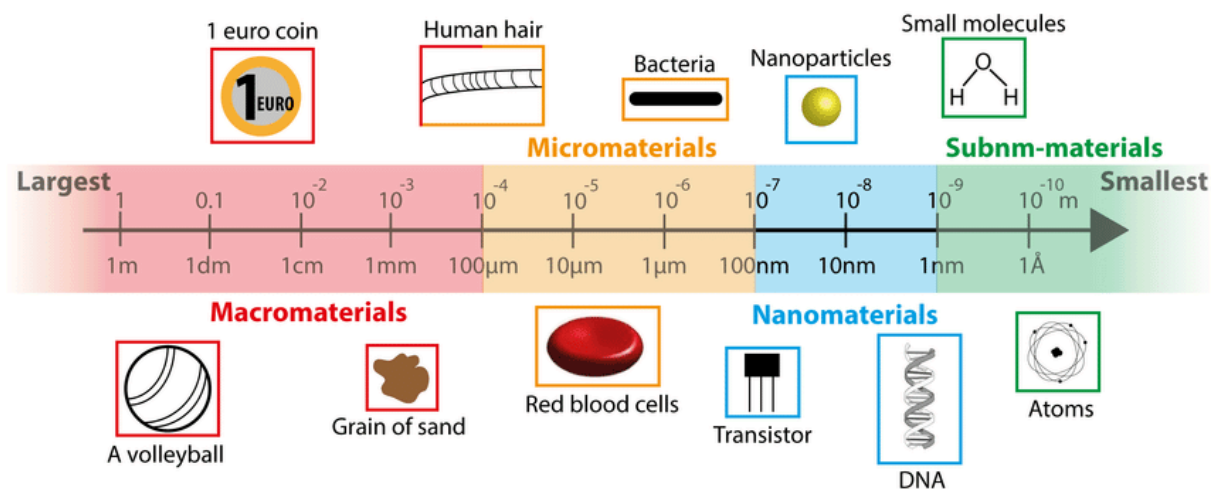
Nanotehnologija je postigla golem napredak tijekom posljednjeg desetljeća, što je potkrijepljeno 25-strukim povećanjem između 2005. i 2010. u broju proizvoda koji sadrže ili zahtijevaju nanočestice (NP) za svoju proizvodnju [10]. U području nanotehnologije, metalne nanočestice pokazale su brojna svojstva i otključala mnoge nove putove u nanotehnologiji. Razvoj nanotehnologije bio je postupan proces, potaknut napretkom u alatima za karakterizaciju, metodama sinteze i prepoznavanjem jedinstvenih svojstava koje nanomaterijali posjeduju.

2.2. Svojstva tvari na nanometarskoj skali

U prirodi četiri sile utječu na atome, gravitacijska sile, elektromagnetska sile, jaka nuklearna sila i slaba sila. *Jaka nuklearna sila* drži protone i neutrone u jezgri atoma. Ta je sila

ograničenog dometa i ima mali utjecaj izvan dometa jezgre. *Gravitacijska sila* je funkcija mase i udaljenosti i slaba je između čestica nano veličine. Gravitacijska sila zanemariva je na nanoskali (Slika 4.) jer je masa objekta na nanoskali vrlo mala. *Elektromagnetska sila* funkcija je naboja i udaljenosti. Na nju ne utječe masa, tako da može biti vrlo jaka čak i kod čestica nano veličine. [11]

Površine nanočestica odgovorne su za neka svojstva na nanoskali. Kako se veličina smanjuje, površina se povećava. Površina uzrokuje promjene u vremenu reakcije tvari. Što je veći omjer površine i volumena u odnosu na tvar koja reagira, to je kraće vrijeme reakcije. Količina izložene površine drastično se povećava na razini nanoskale, što je razlog povećanja vremena reakcije za kemijske reakcije. Tvari na razini nanoskale imaju veći omjer površine i volumena, što uzrokuje vrlo brzu reakciju. Male čestice imaju veći postotak atoma na svojoj površini, što objašnjava povećani omjer površine i volumena. Neka svojstva ovise o veličini: veličina ili površina čestica određuje funkcionalnost, ponašanje i izgled materijala. Svojstva koja ovise o veličini mogu se kategorizirati kao svojstva kojima dominira veličina ili dominira površina. [11]



Slika 4. Prikaz nanometarske skale, nanomaterijali imaju karakterističnu dimenziju u rasponu veličina od 1 do 100 nm [12]

Na nanoskali, svojstva kao što su talište, fluorescencija, električna vodljivost, magnetska propusnost i kemijska reaktivnost mogu se mijenjati kao funkcija veličine čestice [13]. Električna svojstva mogu se mijenjati na nanoskali. Neki materijali koji su vodiči mogu postati poluvodiči ili loši vodiči na nanoskali. Neki materijali koji su bili poluvodiči mogu

postati vodiči ili supravodiči. Ograničenje elektrona rezultira električnim svojstvima koja se javljaju na nanoskali.

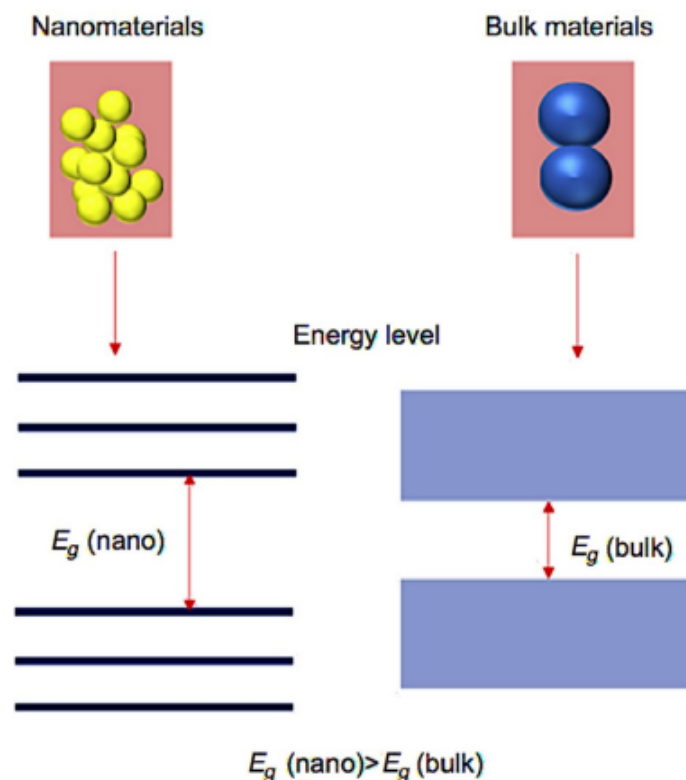
Optička svojstva također ovise o veličini. Elektroni se ne mogu kretati tako slobodno na nanoskali i postaju ograničeni. Ograničenje elektrona uzrokuje njihovu različitu reakciju na svjetlost. Zlato će se, na primjer, pojaviti kao zlato na makro skali u masovnom obliku. Međutim, kada se pojavljuje kao čestica nano veličine, njegova boja je crvena. Nanovelike čestice cinkovog oksida neće raspršiti vidljivu svjetlost, zbog čega krema za sunčanje izgleda prozirno. Velike čestice cinkovog oksida koje se koriste za zaštitu od sunca raspršuju vidljivu svjetlost i izgledaju bijele. Kvantne točke mijenjaju svoj optički izgled kako se veličina čestica smanjuje stvarajući različite boje [11]. Fenomen dikroizma znanstvenici su pokušali objasniti uz pomoć transmisijske elektronske mikroskopije (TEM). Uočeni dikroizam (dvije boje) posljedica je prisutnosti nanočestica promjera 50–100 nm. Rentgenska analiza pokazala je da su te nanočestice srebrno-zlatna (Ag-Au) legura, s omjerom Ag:Au od oko 7:3, koja dodatno sadrži oko 10% bakra (Cu) raspršenog u staklenoj matrici. Nanočestice Au proizvode crvenu boju kao rezultat apsorpcije svjetla (~520 nm). Crveno-ljubičasta boja je posljedica apsorpcije od strane većih čestica, dok se zelena boja pripisuje raspršenju svjetlosti koloidnim disperzijama nanočestica Ag veličine > 40 nm [1].

Druga kategorija površinski dominiranih svojstava uključuje svojstva kontrolirana površinom. Talište, brzina reakcije, kapilarno djelovanje i adhezija su svojstva koja su kontrolirana njihovom površinom. Zlato daje primjer kako se talište materijala može mijenjati s veličinom. Na makro skali, zlato ima talište od 1064 °C. Kako se veličina njegove čestice smanjuje na promjer od 100 nm do 10 nm, njegove temperature taljenja padaju za oko 100 °C [11].

Površinski naboj igra važnu ulogu u opisivanju svojstava i funkcionalnosti nanomaterijala. Priroda i veličina sile površinskog naboja su značajni čimbenici koji definiraju stabilnost, agregaciju i afinitet nanomaterijala prema okolišu i funkcionalnim skupinama. Površinski naboj također određuje koloidno ponašanja koje specifično utječe na odgovor organizma na izloženost nanomaterijalima mijenjajući njihov oblik i veličinu kroz stvaranje agregata ili aglomerata [5]. Metalne nanočestice imaju poseban utjecaj na odgovarajuće funkcionalne skupine. Mogu se sintetizirati i modificirati što bi im omogućilo da se vežu s ligandima, antitijelima, lijekovima. Najvažnija značajka nanočestica je njihov omjer površine i

volumena, što im omogućuje laku interakciju s drugim česticama. Kod nanočestica, visok omjer površine i volumena čini difuziju bržom i izvedivom na nižim temperaturama. Nanočestice srebra i zlata učinkovite su u inhibiciji rasta gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija [14].

Što su dimenzije nanostrukture manje, to je veći razmak između energetske razine, što dovodi do spektra diskretnih energija. Kada se veličina čestica smanji na nanomjeru, svojstva kao što su talište, fluorescencija, električna vodljivost, magnetska propusnost i kemijska reaktivnost mijenjaju se kao funkcija veličina čestice, ali ta svojstva ne ovise samo o veličini materijala. Kako se nanotehnologija kreće prema primjenama u elektronici i medicini, postaje jasno da oblik materijala također igra jednako važnu ulogu u kontroli svojstava nanomaterijala [5]. Na Slici 5. prikazan je dijagram energetske razine za nanomaterijale i rasute materijale (eng. *bulk materials*).



Slika 5. Shematski prikaz dijagrama energetske razine za nanomaterijale i rasute materijale

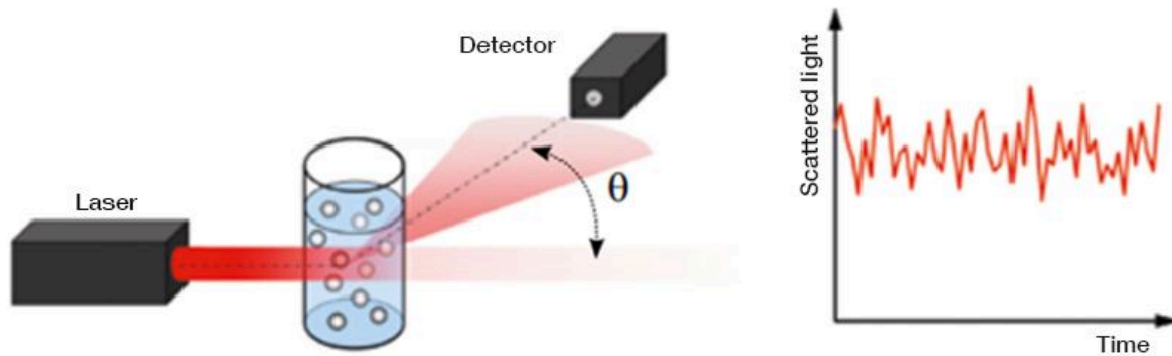
[5]

Na temelju istraživanja toksičnosti i antimikrobnog djelovanja, metalne nanočestice su dobar izbor kao antibakterijska sredstva u razvoju novih dezinficijensa. Međutim, potrebno je poduzeti daljnje mjere kako bi se osigurala sigurna i ekološki prihvatljiva uporaba metalnih nanočestica. Kako bi se to postiglo, ključno je utvrditi parametre toksičnosti za metalne nanočestice različitih sastava, veličina i koncentracija. Nanočestice (NP), materijali veličine od 1-100 nm, posebno su učinkovite u uništavanju mikroorganizama. Metalne nanočestice privukle su pozornost kao potencijalni biocidi zbog svojih jedinstvenih svojstava, što ih čini obećavajućim kandidatima za visok antimikrobni kapacitet. Njihova mala veličina i posebna svojstva omogućuju nanomaterijalima da prodru u prokariotske stanice. Veliki omjer površine i volumena nanočestica povećava njihovu interakcijsku površinu s bakterijama, a mogu se funkcionalizirati ligandima koji olakšavaju kontakt s mikroorganizmima. [15] Male veličine nanočestica daju im sposobnost prodiranja kroz fiziološke barijere živih organizama, uzrokujući štetne biološke reakcije. Poznato je da nanočestice ulaze u ljudsko tijelo kroz pluća, crijevni trakt ili kožu te mogu biti toksične za mozak, uzrokovati upalu pluća i srčane probleme. U stvari, utvrđeno je da određene nanočestice uzrokuju trajna oštećenja stanica putem ozljeda organa i oksidativnog stresa, zbog svoje veličine i sastava. [16]

2.3. Metode i postupci za karakterizaciju nanočestica

Potrebno je karakterizirati nanočestice kako bi se razumjela kontrola sinteze i njihova šira primjena. Dostupne su različite tehnike za sintezu nanočestica bakra. Mikroskopske tehnike kao što su difrakcija X-zraka (XRD), transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), UV-Vis spektroskopija, pretražna elektronska mikroskopija (SEM), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), termogravimetrijska analiza (TGA), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), energetska-disperzijska rendgenska spektroskopija (EDX ili EDS), niskopropusna spektralna analiza (LPSA), transmisijska elektronska mikroskopija visoke rezolucije (HR-TEM), pretražna transmisijska elektronska mikroskopija (STEM), fotoelektronska spektroskopija X-zraka (XPA) i mikroskopija atomske sile (AFM) obično se koriste za karakterizaciju nanočestica. Neka od važnih fizičkih svojstava kao što su veličina i oblik čestice, raspodjela veličine, kristalnost i morfologija nanočestica istražena su pomoću ovih tehnika karakterizacije [17].

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) pruža informacije o srednjoj veličini čestica kao i distribuciji veličine čestica te pokriva širok raspon veličina svega od nanometra pa do nekoliko mikrometara. Raspršena svjetlost suspendiranih čestica u koloidnoj suspenziji daje informacije o fizičkim svojstvima uzorka. Ove suspendirane čestice u otopini imaju kontinuirano kretanje zbog Brownovog gibanja; ako se primijeni električni potencijal, čestice postižu određenu brzinu [18]. Princip rada DLS-a prikazan je na Slici 6.

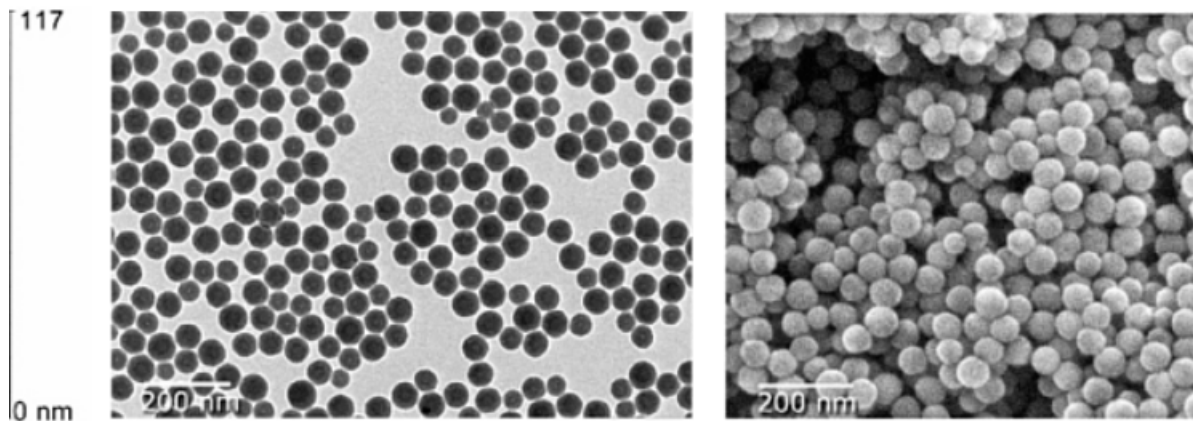


Slika 6. princip rada DLS-a, lasersko svjetlo pogađa čestice u suspenziji, a detektor visoke vremenske rezolucije mjeri intenzitet raspršene svjetlosti pod određenim kutom θ ; intenzitet raspršene svjetlosti posljedica je Brownovog gibanja čestica koje fluktuiraju tijekom vremena [19]

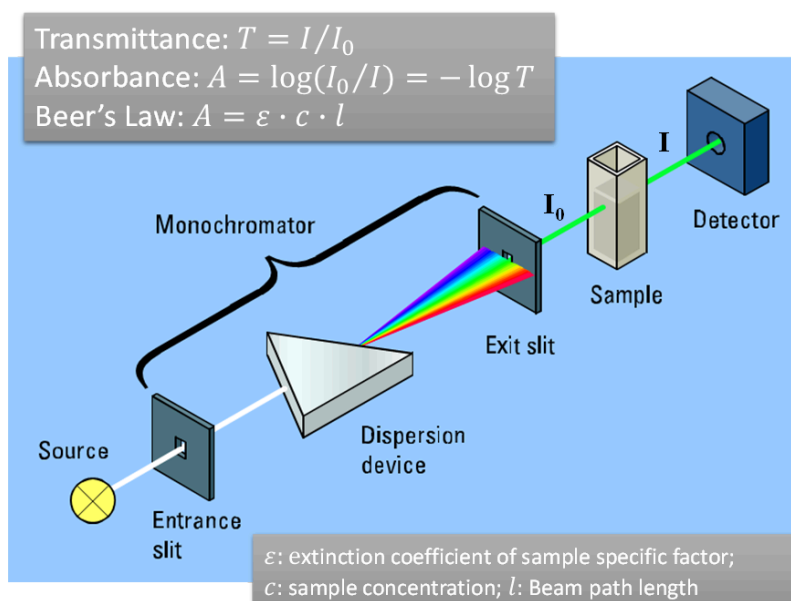
Morfološka i topografska svojstva Cu-NP mogu se ispitati skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) te se rezultati mogu koristiti za procjenu prosječne veličine nanočestica pomoću statističkog softvera. Za morfološku procjenu i određivanje oblika bolje je korištenje transmissijske elektronske mikroskopije (TEM) nad SEM-om, zahvaljujući činjenici da TEM nudi veće povećanje, rezoluciju, točne informacije o obliku, kristalnosti i veličini u usporedbi sa SEM-om. Na Slici 7. prikazana je usporedba slika dobivenih korištenjem SEM-a i TEM-a. TEM prenosi ili raspršuje elektrone iz tankog uzorka pomoću jednolikih strujnih elektronskih zraka. TEM može dati točne procjene homogenosti nanočestica, ali ima poteškoća pri kvantificiranju velikog broja čestica. Još jedno ograničenje je da stvara nepouzdana slika zbog posljedica orijentacije [20].

Difrakcija X-zraka (XRD) je metoda karakterizacije koja se nedavno počela koristiti za karakterizaciju nanočestica. Može pružiti informacije o kristalnoj strukturi i veličini zrna, prirodi faze i parametrima rešetke [22].

Nanomaterijale je teško vidjeti, ali njihova interakcija svjetlom može otkriti mnogo informacija o njima, zbog čega je UV-Vis spektroskopija postala važna tehnika za njihovu karakterizaciju. U UV-Vis spektroskopiji, obasjava se uzorak snopom svjetlosti, a detektor postavljen iza uzorka mjeri intenzitet svjetlosti koja se kroz njega prenosi. Razlika između intenziteta izvorne svjetlosne zrake i izmjenog detektorom pokazuje koliko je svjetla apsorbira uzorak [23]. UV/Vis spektroskopija može otkriti različite informacije o nanomaterijalu kao što su veličina, oblik, sastav i električna svojstva. Princip rada UV/vis spektroskopije prikazan je na Slici 8.



Slika 7. Usporedba slika dobivenih TEM-om (lijevo) i SEM-om (desno) [21]



Slika 8. molekule apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo svjetlo. Apsorpcija se može prikazati kao transmitancija (T) ili apsorbancija (A). Različite molekule apsorbiraju zračenje različitih valnih duljina. [24]

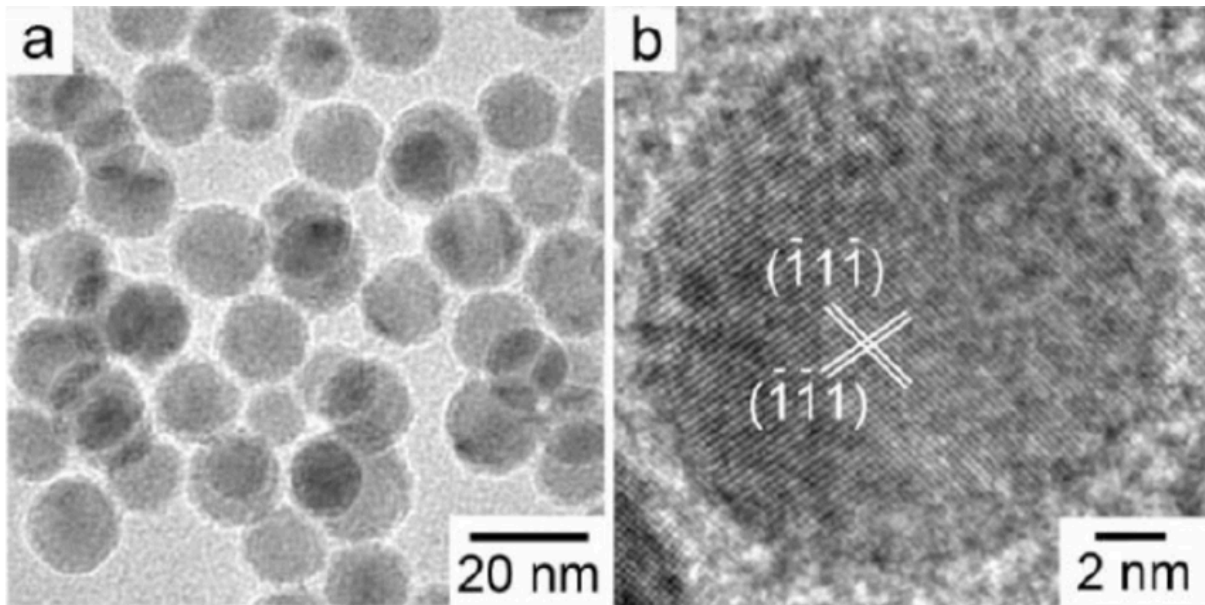
3. Nanočestice bakra

Nanočestice bakra (Cu-NP) (Slika 9.) male su čestice (1–100 nm) s ultraljubičastom vidljivom osjetljivošću, električnim, katalitičkim, toplinskim i antibakterijskim svojstvima ovisno o njihovom visokom omjeru volumena i površine.

Te se nanočestice (NP) sintetiziraju fizičkim, kemijskim i biološkim metodama, koje dovode do stvaranja visoko toksičnih nusproizvoda. U tom smislu, većina Cu-NP-ova proučavanih u biomedicinskom polju dobivena je korištenjem zelenih tehnika. [25]

Materijali na bazi bakra mogu poticati i podvrgnuti se različitim reakcijama zbog širokog raspona dostupnih bakrenih oksidacijskih stanja (Cu^0 , Cu^I , Cu^{II} i Cu^{III}), koja omogućuju reaktivnost putem jednog ili dva elektrona.

Zbog svojih jedinstvenih karakteristika i svojstava, nanokatalizatori na bazi bakra pronašli su mnoge primjene u nanotehnologiji, uključujući katalitičke organske transformacije, elektrokatalizu i fotokatalizu. [26]



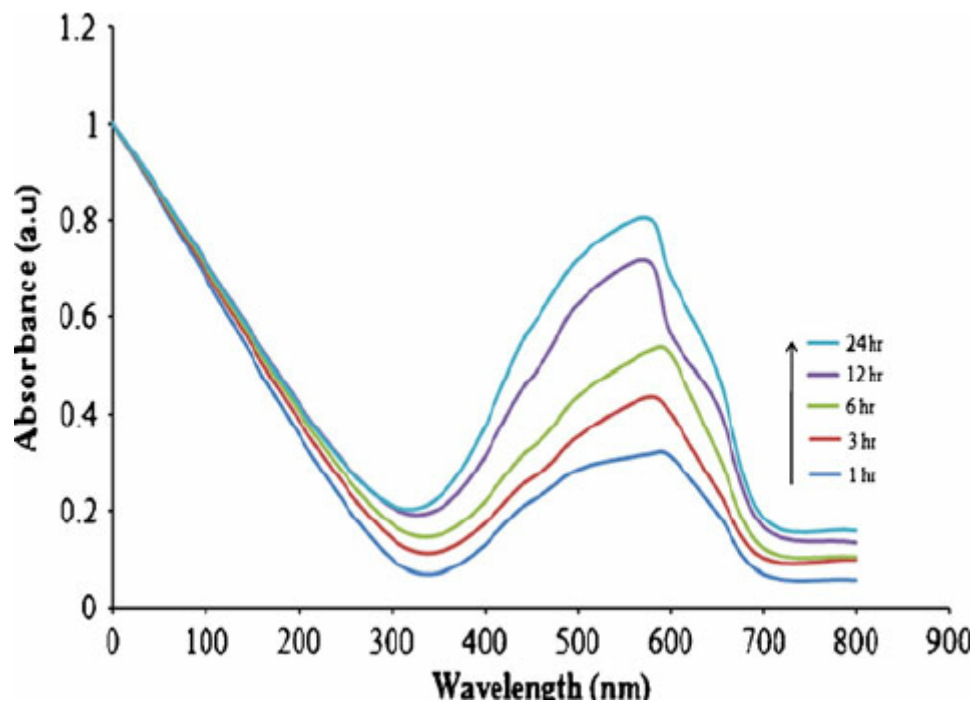
Slika 9. Nanočestice bakra dobivene (a) transmisijskom elektronskom mikroskopijom i (b) transmisijskom elektronskom mikroskopijom visoke rezolucije [27]

3.1. Fizikalna i kemijska svojstva

Visoko vrelište bakra čini ga kompatibilnim s kemijskim reakcijama na visokim temperaturama i pod visokim tlakom, uključujući reakcije kontinuiranog toka, reakcije potpomognute mikrovalovima, reakcije u fazi pare i razne organske transformacije. Takva jedinstvena svojstva, pogodna za razvoj reaktivnih i selektivnih katalitičkih sustava, učinila su bakar i njegove legure među najvrijednijim metalima u prošlosti, a osigurat će da ostanu važni i u budućnosti. [26]

Zbog manje veličine čestica na površini je prisutan velik broj atoma. Omjer površine i volumena čestica varira ovisno o obliku i veličini nanočestica, uključujući ultraljubičastu – vidljivu osjetljivost i vodljivost. Karakteristična svojstva uključujući elektronsku razinu energiju, afinitet prema elektronu, elektronski prijelazi, magnetska svojstva, fazni prijelaz, talište i afinitet prema polimerima, biološkim i organskim molekulama također se mijenjaju

promjenom površine. [28] UV-vidljivi apsorpcijski spektar bakra prikazan je na Slici 10. te se maksimumi apsorpcije javljaju pri valnim duljinama između 550 i 600 nm.



Slika 10. UV-vidljivi apsorpcijski spektri nanočestica bakra sintetiziranih u vremenskom trajanju od 24 sata [29]

Nanočestice bakra imaju antimikrobna svojstva. Bakar ulazi u mikrobne stanice u obliku iona, mijenja pH razinu i funkciju membranskih kanala, uništava funkcionalne skupine i strukturu stanice i unutarnje membrane i proizvodi reaktivne kisikove vrste (ROS) koje mogu uzrokovati nepovratna oštećenja poput oksidacije proteina, pucanja ključnih unutarnjih molekula poput enzima, DNA i RNA, te uništavanje cijele stanične membrane uslijed lipidne peroksidacije slobodnih radikala. Ioni bakra koče razvoj bakterijske rezistencije kroz više mehanizama istovremeno. Bakterijske membrane se oštećuju kada dođu u dodir s bakrenim površinama. Bakreni ioni imaju sposobnost izravnog oštećenja bakterijskih proteina i, preko reakcije slične Fentonovoj, stvaraju izuzetno reaktivne hidroksilne radikale ($\cdot\text{OH}$) koji u interakciji s drugim proteinima, DNK i enzimima uzrokuju peroksidaciju lipida i uništavanje membranskih struktura. [30]

3.2. Postupci dobivanja

Nanomaterijali se općenito biraju na temelju njihove željene primjene. Mogu se sintetizirati kemijskim, fizikalnim ili biološkim metodama. Općenito, ovisno o izvoru elektrona, metode sinteze mogu se podijeliti u zelene, ako je redukcijsko sredstvo biološki organizam (bakterije, plijesni, alge, biljke), u kemijske, ako je redukcijsko sredstvo kemijski spoj i na kraju fizikalne, kada izvor je fizički, kao što je električna energija. Kemijske metode uključuju koprecipitaciju, kemijsku redukciju metalnih soli, elektrokemijske procese (elektrolizu), mikroemulziju, pirolizu, fotokemijske reakcije (zračenje), sonokemiju, sol-gel i solvotermalne tehnike. Fizičke metode uključuju lučno pražnjenje, litografiju elektronskim snopom, ionsku implantaciju, kondenzaciju inertnog plina, mehaničko drobljenje, mljevenje i pirolizu raspršivanjem. Biološke metode obično se oslanjaju na pristupe biosinteze korištenjem biljnih ekstrakata, bakterija, gljivica, algi, enzima i biomolekula. [9]

Općenito, ovisno o izvoru elektrona, metode sinteze mogu se podijeliti u zelene, ako je redukcijsko sredstvo biološki organizam (bakterije, plijesni, alge, biljke), u kemijske, ako je redukcijsko sredstvo kemijski spoj i na kraju fizikalne, kada izvor je fizički, kao što je električna energija. [22]

Glavni izazov u pripremi nanočestica bakra je pripremiti nanomaterijale koji su visoko aktivni, selektivni, stabilni, robusni i jeftini. Priprema bakrenih nanočestica puno je teža u usporedbi s plemenitim metalima zbog mogućnosti oksidacije bakra zrakom. Metalne bakrene nanočestice dobile su mnogo pozornosti u usporedbi sa svim drugim plemenitim metalima kao što su Ag, Au i Pt zbog svoje male veličine, visokog omjera površine i volumena te poboljšanja veličine, oblika i otpornosti na oksidaciju. Čestice bakra imaju tendenciju oksidacije kada su izložene zraku i dolazi do aglomeracije čestica zbog površinske oksidacije. Kako bi se izbjegao ovaj problem, nanočestice bakra proizvode se u atmosferi inertnog plina ili u nekim slučajevima koriste se zaštitni polimeri ili površinski aktivne tvari za inhibiciju oksidacije. [17]

Većina metoda dobivanja nanočestica bakra je ili "odozdo prema gore" (engl. *bottom-up*) (u kojoj se prekursori na atomskoj razini koriste za sintezu materijala nano veličina) ili "odozgo prema dolje" (engl. *top-down*) (u kojoj se rasuta čvrsta tvar razgrađuje

na sve manje komponente). Iako oba pristupa imaju svoje prednosti i nedostatke, pristup odozdo prema gore postao je popularniji jer nudi veći opseg za kontrolu oblika i veličine dobivenih nanočestica. [26]

Širok raspon nanočestica može se proizvesti metodom odozgo prema dolje ili fizičkom metodom s malim izmjenama, ali kvaliteta proizvoda nije dobra u usporedbi s kemijskim metodama i zahtjeva posebnu opremu i vakuumske sustave za proizvodnju nanočestica. U slučaju kemijskih metoda, veličina, rast, morfologija i raspodjela čestica mogu se kontrolirati optimiziranjem uvjeta reakcije kao što su vrijeme reakcije, pH i omjer elektrolita i površinski aktivne tvari, zaštitno sredstvo, vrsta otapala i sredstvo za zatvaranje. Korištenjem optimalnih uvjeta vrlo je lako dobiti usku distribuciju veličina čestica. Često korišteni surfaktanti su polisorbat 40 i polisorbat 60. Međutim, ova metoda dovodi do nusproizvoda koji su opasni za okoliš. U usporedbi s ovim metodama, zelena sinteza nanočestica bakra je sigurnija i ekološki prihvatljivija. [28]

3.3. Zeleni postupci dobivanja

Zelena sinteza metalnih nanočestica koristi se zbog neškodljive metode dobivanja. Kao redukcijsko sredstvo koriste se molekule u biljkama i mikroorganizmima (bakterije, gljive). Prednost korištenja ove metode su ekološki prihvatljivi materijali, jeftinija je od kemijske sinteze, jednostavnija, brža i održivija. Za dobivanje nanočestica bolje je koristiti biljne ekstrakte nego mikroorganizme zbog povećanih poteškoća u očuvanju staničnih kultura. [22]

Nekoliko čimbenika utječe na ovu metodu, uključujući temperaturu, pH, vrijeme reakcije, volumen dodanih reagensa i volumen biološkog ekstrakta. Interakcija ovih čimbenika ključna je za određivanje oblika i veličine sintetiziranih nanočestica. Razne biljke i njihovi dijelovi izvrsni su proizvođači nanočestica bakra, poput ekstrakta lista *Hagenia abyssinica* L., soka *Citrus medica* Linn. i *Syzygium guineense*. Biljke su izvrsni proizvođači nanočestica bakra jer su široko dostupne, lako se prerađuju i izvor su mnogih metabolita. [31]

Primarni mehanizmi predloženi u sintezi bakrenih nanočestica na biljnoj bazi su:

1. Istraživanja podupire otkriće da se bioredukcija metalnih iona događa zbog prisutnosti proteina koji hvata metalne ione i dolazi do redukcije. To dovodi do promjene u sekundarnoj strukturi proteina i stvaranja jezgri metalnih iona i pomaže u izgradnji NP-ova.
2. Najprihvaćeniji pristup je biljni ekstrakt koji sadrži različite fitokemikalije. Na temelju dostupnih literaturnih podataka, oni podržavaju da niti jedan određeni aktivni sastojak ili fitokemikalija nije odgovoran za smanjenje nanočestica. Ipak, razne druge biljne komponente i sekundarni metaboliti također igraju bitnu ulogu. Neki aktivni spojevi uključuju višestruke proteine, enzime, aminokiseline, vitamine, polisaharide, polifenole, alkaloidne, flavonoide i organske kiseline. [31]

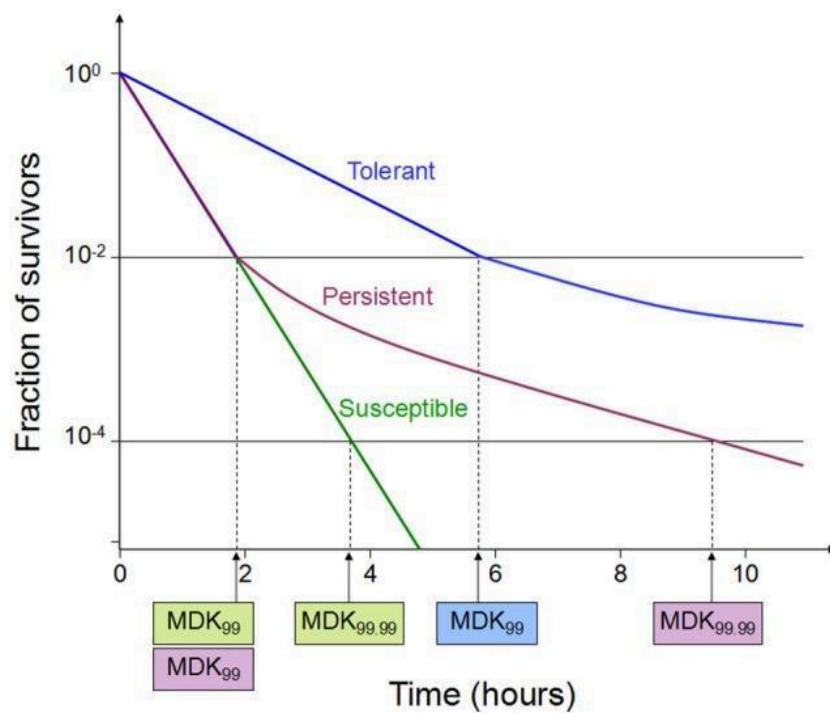
Zelena sinteza je jednostavna, isplativa, pouzdana i energetski učinkovita metoda koja omogućava veliku proizvodnju ekološki prihvatljivih materijala te time olakšava njihovu rasprostranjenost i uporabu u mnogim industrijama. Zelena nanotehnologija igra važnu ulogu u održivosti jer osigurava minimalan utjecaj na okoliš i potrošnju resursa.

4. Antimikrobno djelovanje

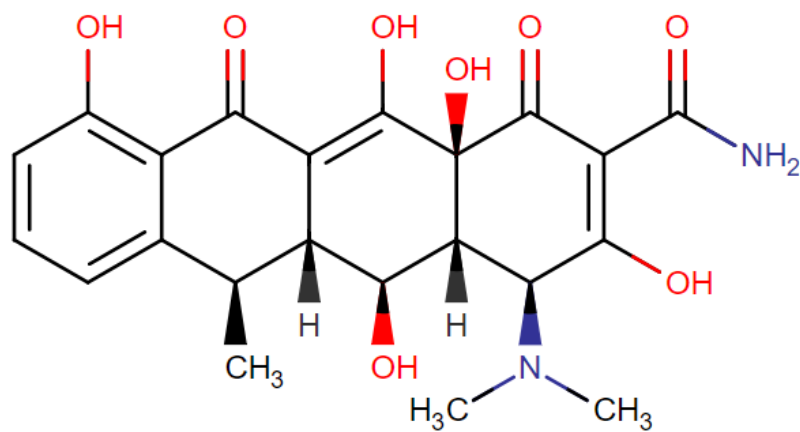
Antimikrobno djelovanje odnosi se na sposobnost tvari ili lijeka da inhibira ili ubije rast i reprodukciju. Na učinkovitost antimikroba utječu mnogi čimbenici: (1) bakterijski status (osjetljivost i otpornost, tolerancija, postojanost, biofilm) i veličina inokuluma; (2) antimikrobne koncentracije [prozor odabira mutanata (eng. *mutant selection window*, MSW) i sub-inhibicijska koncentracija]; (3) čimbenici domaćina (učinak u serumu i utjecaj na crijevnu mikrobiotu). Dodatna razumijevanja u vezi uporabe antimikrobnih sredstava, bakterijskog statusa i odgovora domaćina nude nam nove uvide i potiču borbu za osmišljavanje načina antimikrobnog liječenja koji postižu bolji klinički ishod i istovremeno minimiziraju pojavu rezistencije. Za antimikrobno djelovanje važno je definirati bakterijski status jer se bakterijski fenotipi razlikuju prilikom izlaganja antibioticima. Osjetljivost i otpornost mjere se minimalnom inhibicijskom koncentracijom (MIC). MIC se definira kao minimalna koncentracija antibiotika za inhibiciju rasta bakterija. MIC se obično određuje

izlaganjem određene količine bakterijske populacije nizu rastućih koncentracija antibiotika u standardiziranom mediju za rast oko 16-20 h. Tolerancija je sposobnost bakterije da ostane na životu u kratkotrajnoj izloženosti antibioticima, što se odnosi samo na baktericidne antibiotike. Za postizanje iste razine ubijanja kod tolerantnog soja, kao kod osjetljivog soja, potrebno je dulje vrijeme izloženosti antibiotiku, a ne visoka koncentracija. Tolerantne i netolerantne bakterije ne moraju se razlikovati u MIC vrijednosti. Minimalno trajanje ubijanja (MDK) koje se može dobiti iz krivulja vremena ubijanja predlaže se kao kvantitativna mjera tolerancije (Slika 11.). [32]

Doksiciklin (Slika 12.) je bakteriostatsko sredstvo širokog spektra (antibiotik) sintetski izvedeno iz prirodnog tetraciklina kojeg proizvode bakterije vrste *Streptomyces* poznate kao oksitetraciklin te je član tetraciklinske klase antibiotika. [26] Dioksicilin ima antimikrobno djelovanje inhibicijom sinteze proteina te suzbija rast gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija i drži ih u stacionarnoj fazi. Sinteza proteina neophodna je za preživljavanje i funkcioniranje stanica, uključujući bakterije. Doksiciklin inhibira sintezu bakterijskih proteina alosteričnim vezanjem na 30S prokariotsku ribosomsku podjedinicu. Lijek blokira povezanost nabijene aminoacil-tRNA (aa-tRNA) s ribosomskim A mjestom, koje je akceptorsko mjesto na kompleksu mRNA-ribosom. Doksiciklin u konačnici sprječava fazu elongacije sinteze proteina i zaustavlja proizvodnju esencijalnih proteina za preživljavanje i funkcioniranje bakterija.



Slika 11. Krivulje osjetljivosti (eng. *susceptibility*), tolerancije (eng. *tolerance*) i postojanosti (eng. *persistence*) [32]



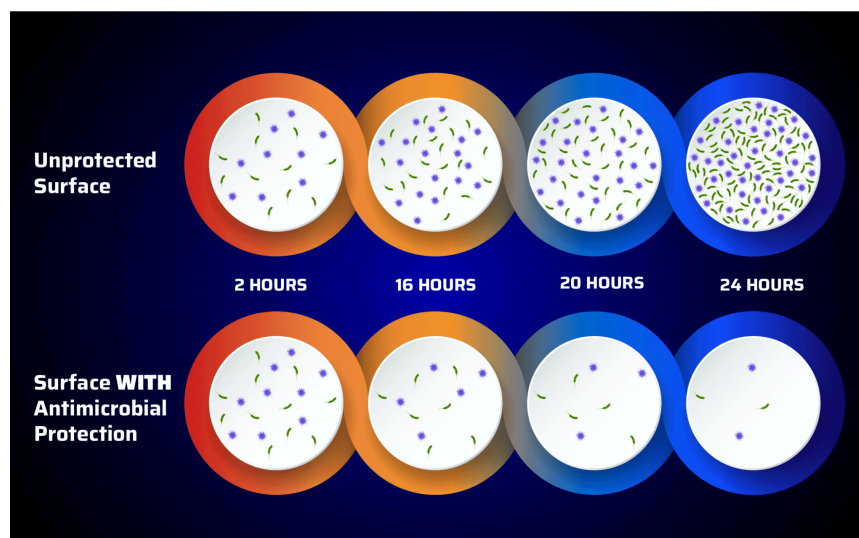
Slika 12. Struktura doksiciklina [33]

4.1. Definicija i važnost antimikrobne zaštite

Antimikrobna zaštita remeti metabolizam kontaminirajućih mikroba te time sprječava pretvaranje hranjivih tvari u energiju čime se inhibira preživljavanje, rast i reprodukcija mikroba.

Antimikrobna zaštita štiti različite materijale kao što su plastika, metali, tekstil i drugi. Ukoliko su nezaštićeni, mnogi materijali mogu brzo podleći razvoju mikroba, kao što su bakterije, plijesan i alge koji se potom razmnožavaju i stvaraju ozbiljan problem. Tijekom vremena materijali mogu degradirati, što skraćuje njihov vijek trajanja. Posebnu važnost antimikrobna zaštita ima u sektoru zdravstva.

Antimikrobne tvari jedno su od najvažnijih otkrića te su spasile mnoge živote. Jedno od najznačajnijih antimikrobnih tvari su antibiotici koji se danas koriste za tretiranje i prevenciju mnogih bakterijskih infekcija. Veliki problem danas stvara pojava antimikrobne rezistencije (AMR) do koje dolazi zbog prekomjerne uporabe antimikrobnih tvari. Slika 13. prikazuje razvoj mikroorganizama na površini bez i sa antimikrobnom zaštitom tijekom 24 h.



Slika 13. Usporedba površine bez antimikrobne zaštite i sa antimikrobnom zaštitom [34]

4.2. Antimikrobna rezistencija

Veliku pozornost privlači velika pojava rezistencije različitih mikroorganizama na većinu antimikrobnih sredstava. Antimikrobna rezistencija javlja se kada mikroorganizmi

poput bakterija, gljivica, virusa i parazita razviju mehanizme kojima mogu izdržati učinke antibiotika i drugih antimikrobnih sredstava, čineći infekcije težim za liječenje i povećavajući rizik od prijenosa bolesti, morbiditeta i mortaliteta. Svjetska organizacija za zdravlje životinja, Organizacija za hranu i poljoprivredu i Svjetska zdravstvena organizacija komentirale su ozbiljnu prijetnju koju predstavljaju patogeni organizmi otporni na antimikrobne lijekove za zdravlje ljudi i životinja. Opsežna uporaba kemoterapijskih antimikrobnih sredstava stvorila je selektivni pritisak za poticanje eskalacije stope antimikrobne rezistencije.

Otpornost mikroorganizama na antibiotike u stalnom je porastu, s izvješćima koja pokazuju da je velik broj postojećih priznatih antimikrobnih sredstava pokazao otpornost na jednu ili drugu vrstu mikroorganizama, tako da u osnovi ne postoji niti jedno antimikrobno sredstvo dostupno za upotrebu kod ljudi i životinja kojemu nije dokazana otpornost mikroorganizama. [35] Posebni problem stvaraju takozvani MDR organizmi (eng. *multidrug resistance*). MDR bakterije razvile su otpornost na jedan ili više antibiotika koji se koriste za njihovo liječenje.

Otpornost na više lijekova u organizmu može se razviti kada se antibiotici ne koriste pravilno. Uzimanje antibiotika u neodgovarajućem trajanju ili korištenje antibiotika kada nisu potrebni, kao što je kod virusnih infekcija, mogu pridonijeti razvoju rezistencije na više lijekova u organizmu. MDR sojevi također mogu nastati kao rezultat biološkog mehanizma koji daje rezistenciju na više lijekova, zbog više gena koji daju rezistenciju na više antibiotika koji su genetski povezani zajedno na kromosomu ili plazmidu, ili kao rezultat višestrukih mutacija koje daju otpornost na više antibiotika koji se razvijaju u domaćinu.

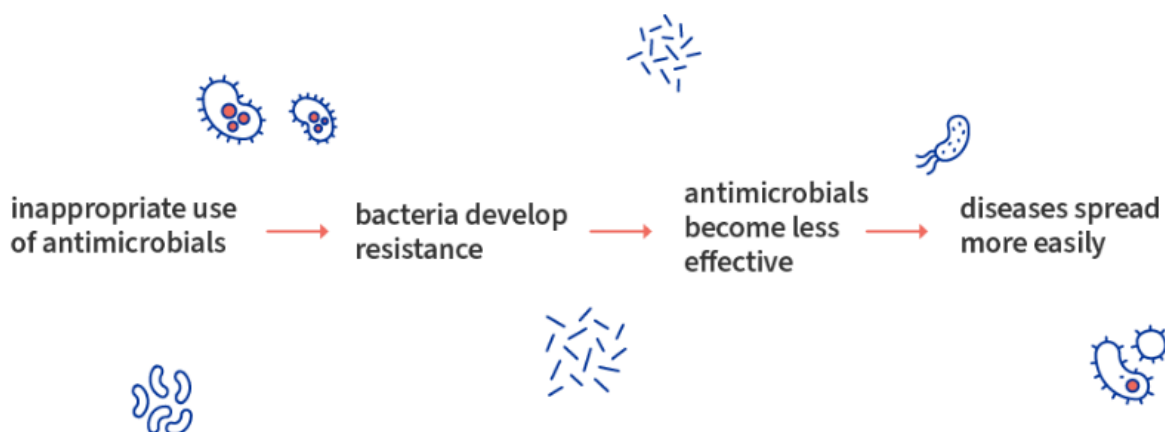
Da bi preživjeli u prisutnosti antibiotika, bakterijski sojevi moraju biti u stanju poremetiti jednu ili više kritičnih faza potrebnih za učinkovito djelovanje antimikrobnog sredstva.

Bakterijske vrste slijede jednu od četiri osnovne strategije preživljavanja:

1. Sprječavanje antibiotika da dosegne cilj u bakterijama smanjenjem njegove sposobnosti prodiranja u mikrobnu stanicu.
2. Antibakterijski agensi se izbacuju iz stanice kroz mehanizam efluksne pumpe.
3. Inaktivacija antibiotika putem modifikacije ili razgradnje.

4. Modifikacija ili promjena antimikrobne mete unutar bakterije. [36]

Važno je razumjeti različite uvjete i mehanizme razvoja antimikrobne rezistencije kako bi se unaprijedila istraživanja usmjerena na prepoznavanje i prevenciju njenih posljedica. Sinteza ili ekstrakcija spojeva kao što su nanočestice s antimikrobnim svojstvima ima potencijalno obećavajuće primjene u borbi protiv stalno rastućeg broja patogenih mikroorganizama rezistentnih na antimikrobne lijekove koji predstavljaju prijetnju zdravlju ljudi i životinja. Slika 14. prikazuje način na koji obično dolazi do antimikrobne rezistencije.



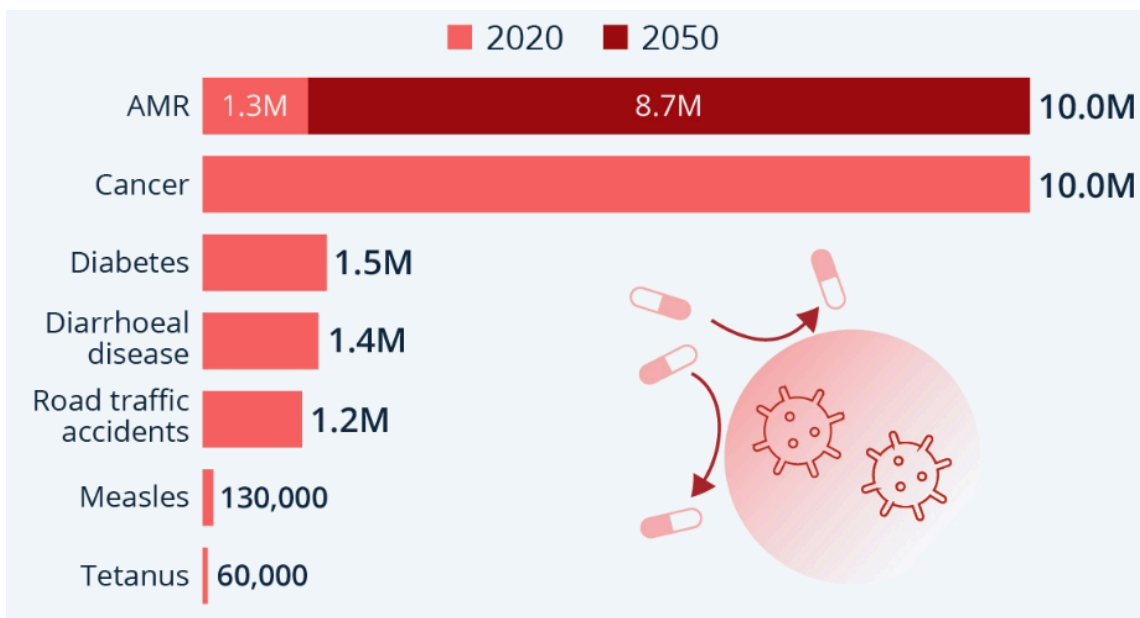
Slika 14. Pojava antimikrobne rezistencije [37]

4.3 Izazovi vezani uz antimikrobnu rezistenciju, utjecaj na globalno zdravlje

Antimikrobna rezistencija jedna je od najvećih globalnih prijetnji javnom zdravlju i razvoju. Antimikrobna rezistencija prijeti zdravlju i dobrobiti ljudi i životinja, okolišu, sigurnosti hrane, gospodarskom razvoju i jednakosti unutar društava. Procjenjuje se da je bakterijska antimikrobna rezistencija bila izravno odgovorna za 1,27 milijuna globalnih smrti u 2019. i pridonijela dodatno 4,95 milijuna smrti. Zlouporaba i prekomjerna uporaba antimikrobnih sredstava kod ljudi, životinja i biljaka glavni su uzrok razvoja patogena otpornih na lijekove. Antimikrobna rezistencija utječe na zemlje u svim regijama i na svim razinama prihoda. te njene posljedice pogoršavaju siromaštvo i nejednakost, a najviše su pogođene zemlje s niskim i srednjim dohotkom. Antimikrobna rezistencija dovodi u opasnost

mnoga dostignuća moderne medicine što otežava liječenje infekcija i čini druge medicinske postupke i tretmane, kao što su operacije, carski rezovi i kemoterapije raka, puno rizičnijim. Osim smrti i invaliditeta, antimikrobna rezistencija ima značajne ekonomske troškove. Svjetska banka procjenjuje da bi mogla rezultirati dodatnim troškovima zdravstvene zaštite od 1 trilijun USD do 2050. i gubitcima bruto domaćeg proizvoda (BDP) od 1 bilijun USD do 3,4 bilijun USD godišnje do 2030. [38]

Na pojavu antimikrobne rezistencije utječe mnogo varijabli kao što su sve veća gustoća bakterijske populacije u domovima zdravlja, loše pridržavanje higijenskih mjera i protokola u bolnicama kako bi se prostori održali čistima, prekomjerna uporaba antibiotika u poljoprivredi, međunarodna putovanja i trgovina, što može dovesti do širenja otpornih bakterija i gena otpornosti, nedostatak sanitarnih uvjeta, što može zagađivati vodovodne sustave i širiti otporne bakterije u kanalizaciji te pretjerana upotreba antibiotika u medicini (Slika 15). Između ostalog, nedostaje brza dijagnostika koja bi pomogla u pravilnoj primjeni antibiotika. Problem otpornosti na antimikrobne lijekove pogoršan nedostatkom interesa farmaceutske industrije za nove investicije u antimikrobne lijekove, budući da istraživanje novih antimikrobnih lijekova smatraju "niskim profitom" i vjeruju da će se rezistencija na nove antimikrobne lijekove razviti prije ili kasnije.



Slika 15. Predviđena smrtnost od infekcija otpornih na antimikrobne lijekove do 2050. godine u odnosu na današnje uobičajene uzroke smrti [39]

Kao rezultat toga, oni radije ulažu u razvoj drugih lijekova za kronične bolesti osim onih koji se koriste za poboljšanje načina života. Kako se antimikrobna rezistencija povećava u mnogim dijelovima svijeta, postaje sve važnije ne samo tražiti nove antimikrobne agense, već i osmisliti strategije za daljnje smanjenje pojave i stope rezistencije ili eventualno suzbijanje brzog razvoja rezistencije na antibiotike od strane patogenih mikroorganizama. Neuspješno liječenje bakterijskih infekcija povezanih s rezistencijom na antibiotike odnosi najmanje 700.000 svake godine u svijetu, a predviđa se da će biti povezano s 10 milijuna smrtnih slučajeva godišnje do 2050. (Slika 15.) [36]

4.4 Izazovi u prekomjernoj upotrebi antibiotika (otpornost, nuspojave), antibiotici u poljoprivredi

Antibiotici su tvari koje se daju u kontroliranim količinama, a namijenjene su ubijanju ili smanjenju rasta mikroorganizama, posebice bakterija. Osim primjene kod ljudi, oni se intenzivno koriste u poljoprivredi za povećanje produktivnosti usjeva, u stočarstvu i stočarstvu za liječenje bolesnih životinja, u svrhe sprječavanja infekcija, te također kao poticatelji rasta u hrani za životinje u kontroliranim koncentracijama. Pretjerana ovisnost o antibioticima rezultirala je pojavom bakterija otpornih na antibiotike koje predstavljaju značajne izazove u učinkovitosti liječenja i mogu dovesti do teških infekcija. Prvi primjeri rezistencije primijećeni su nedugo nakon raširene uporabe penicilina. Ovo je doba označilo početak neprekidne borbe protiv rastuće otpornosti bakterija. Širenje antimikrobne rezistencije dodatno je pogoršano neselektivnom uporabom antibiotika u poljoprivredi i stočarstvu, pridonoseći širenju gena otpornosti. U Europi je zabilježeno da postoji više od 700 000 slučajeva infekcija koje su razvile otpornost na antibiotike. Utvrđeno je da ove infekcije izravno doprinose više od 33 000 smrtnih slučajeva na godišnjoj bazi. Neadekvatan napredak u razvoju novih antimikrobnih lijekova pogoršava problem, jer brzina kojom se razvija rezistencija nadmašuje stopu kojom se identificiraju učinkovite terapije. [40]

Zloupotreba antibiotika može rezultirati višim koncentracijama antibiotika u okolišu, što se može nazvati onečišćenjem antibiotikom. Zbog povećane potražnje za životinjskim bjelančevinama u zemljama u razvoju, potiče se intenzivan uzgoj, što rezultira ostacima

antibiotika u proizvodima životinjskog podrijetla, a na kraju i rezistencijom na antibiotike. Otpornost na antibiotike predstavlja veliki problem za javno zdravlje jer bakterije otporne na antibiotike koje se povezuju sa životinjama mogu biti patogene za ljude te se lako prenose na ljude putem prehrambenog lanca i šire u okoliš putem životinjskog otpada. Kriza povezana s antibioticima pripisuje se zlouporabi antibiotika koji se, u konačnici, ispuštaju u okoliš, prisutnosti ostataka antibiotika (matičnog antibiotika ili njegovih metabolita ili oba pronađena u proizvodima životinjskog podrijetla) u stočarskim proizvodima i otpadu, i na kraju, nedostatak strogo i učinkovitog nadzora i kontrole nad proizvodnjom, uporabom i odlaganjem antibiotika. [41]

5. Nanočestice metala kao antimikrobne tvari

U većini studija o nano-antimikrobnim sredstvima na bazi metala, dokazano je da je biološka učinkovitost materijala značajno veća ili duža od bioaktivnosti samog metala. Pretpostavlja se da je to zbog nekoliko aspekata, uključujući svojstva ovisna o veličini nanometala, kao i visok omjer površine i volumena ultrafinih čestica te nekonvencionalne značajke povezane s prisutnošću površine stabilizatori. U stvari, često se pokazalo da sredstva za zatvaranje prilagođavaju otpuštanje iona nanočestica i posljedično, njihova svojstva protiv biofilma. [42]

Baktericidni kapaciteti nanočestica su višedimenzionalni ovisno o njihovim raznovrsnim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ionski metali oslobođeni iz metalnih nanočestica (MNP) imaju raznovrsna antibakterijska svojstva kao što su snažnu antibakterijsku toksičnost interakcijom s fosfolipidnim slojevima u bakterijskim stanicama ili ometanjem aktivnosti različitih unutarstaničnih biomakromolekula, kao što su DNK i enzimi. Unatoč prirodnim baktericidnim svojstvima metalnih materijala, nanostrukture MNP-a također igraju ključnu ulogu u induciranju antibakterijske učinkovitosti, dinamika sučelja stanica-površina jedan je od ključnih mehanizama za antibakterijski učinak nanočestica, a nanostruktura i topografija površine nanočestica značajno utječu na njihovu antibakterijsku aktivnost. [43] S obzirom na ispiranje i otapanje iona, nekoliko je istraživanja pokazalo da

okolišni čimbenici, poput pH i brzine otapanja NP-a, mogu imati veliki utjecaj na antibakterijsku aktivnost metalnih NP-a [44].

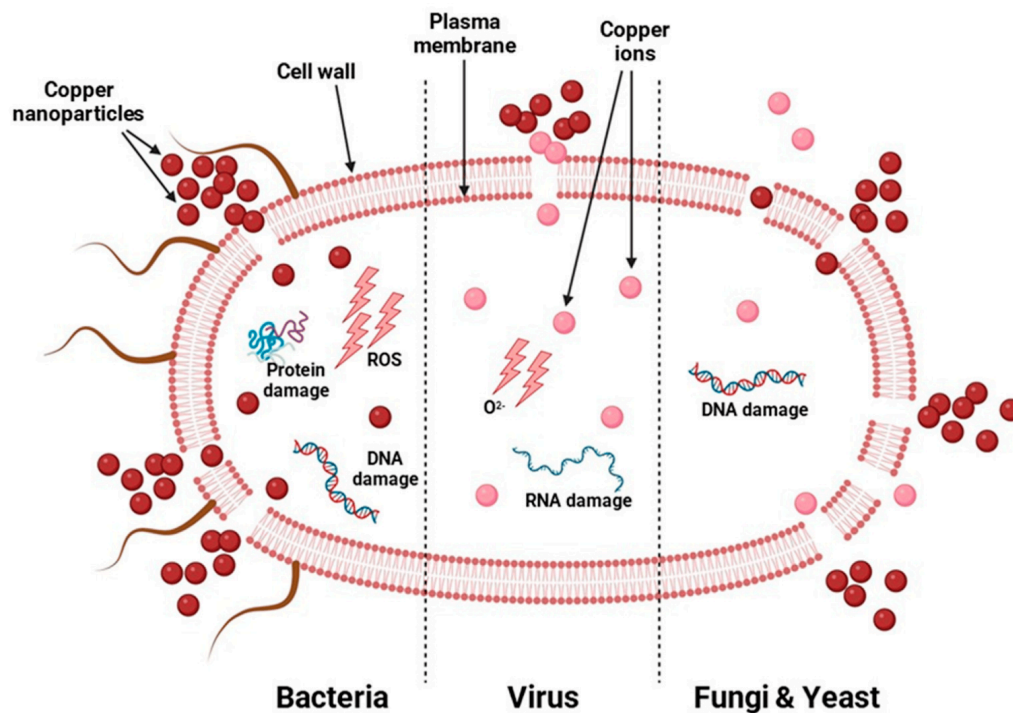
Nanočestice srebra (AgNP) koriste se kao antibakterijska sredstva u kozmetici, proizvodima za zdravstvenu njegu, tekstilnim tkaninama, zavojima i premazima, kao i u kliničkim primjenama, npr. za liječenje kroničnih čireva, dijabetičkih rana otpornih na antibiotike i opekline. Osim toga, kada se AgNP koriste u terapiji rana, oni izazivaju obilno taloženje kolagena, što može ubrzati zacjeljivanje rana i pokazati protuupalne učinke. [44] Različita istraživanja pokazala su da AgNP uzrokuju oksidativni stres, disfunkciju proteina, poremećaj membrane i oštećenje DNK u bakterijama, što u konačnici dovodi do smrti bakterija. Također je utvrđeno da AgNP mijenjaju adheziju bakterijskih stanica kako bi spriječili stvaranje biofilma. [31]

Nanomaterijali na bazi zlata mogu se konstruirati na različite načine kako bi se osiguralo antimikrobno djelovanje. Optimiziranje svojstava može se postići konjugacijom s drugim spojevima ili modificiranjem njihove nanostrukture. Antimikrobna aktivnost također se može postići konjugacijom nanočestica zlata s antitijelima i različitim antimikrobnim agensima. Zlatne nanočestice konjugirane s antibiotikom pokazuju snažno antimikrobno djelovanje protiv raznih bakterija i sojeva otpornih na antibiotike. U farmakologiji, AuNP-ovi nude antiangiogenezu, anti-HIV, antimalarijsku, antimikrobnu i antiartritičnu aktivnost. Biomedicinska upotreba ovih materijala uključuje gensku terapiju, isporuku lijekova, dijagnostiku i katalizatore za medicinsku terapiju.

Cinkov oksid (ZnO) nudi prednosti kao što su visoka otpornost na toplinu, veća selektivnost, niža citotoksičnost i veća stabilnost u usporedbi s anorganskim antimikrobnim sredstvima te može poboljšati interakcije sa stanicama i optimizirati antimikrobnu aktivnost zbog povećane kontaktne površine. Primjena ZnO u proizvodima za zdravstvenu njegu privukla je posebnu pozornost zbog njegove sposobnosti blokiranja UV zračenja. Različita su istraživanja potvrdila da ZnO NP imaju antibakterijsko djelovanje i da te strukture imaju visoku učinkovitost protiv različitih bakterija.

Općeprihvaćeni mehanizam antibakterijskog djelovanja nanomaterijala na bazi bakra temelji se na oslobađanju Cu^{2+} iona. Ioni bakra mogu oštetiti staničnu membranu bakterija i ući u stanice kako bi poremetili funkciju enzima, uzrokujući smrt bakterija (Slika 15.).

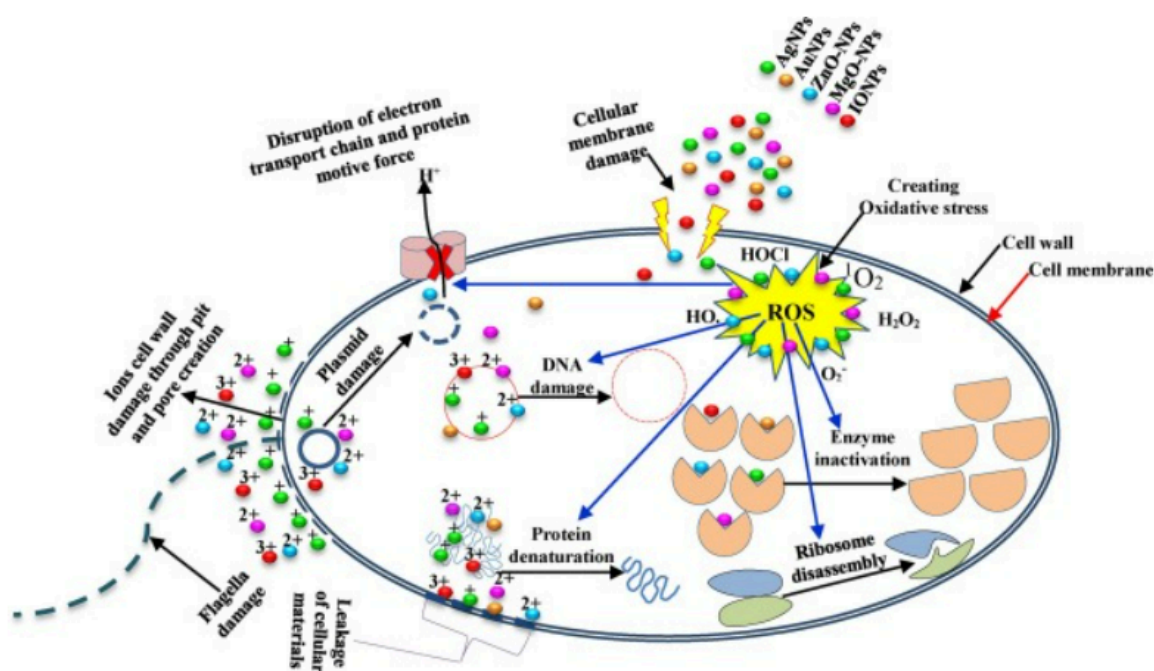
Nanočestice bakra su vrlo reaktivni antimikrobni materijali zbog svog visokog omjera površine i volumena. Među nanočesticama metalnog oksida, CuO NP su od velike važnosti jer su najjednostavniji član bakrene skupine. CuO NP su strukturirani s važnim antimikrobnim svojstvima koja inhibiraju rast virusa, gljivica, bakterija i algi. Spojevi na bazi bakra su materijali s visoko učinkovitim biocidnim svojstvima koji se često koriste u formulacijama pesticida i raznim primjenama u području zdravlja. [44] Raširena uporaba nanočestica na bazi bakra u medicinskim primjenama, uključujući antimikrobna ili antivirusna sredstva, potaknula je istraživače da prošire svoje studije o toksičnosti bakrenih nanomaterijala na mikroorganizme, životinje i ljude. Većina znanstvenih istraživanja pokazuje da je toksičnost nanočestica na bazi bakra povezana s nakupljanjem nanočestica oko stanice, njihovim otapanjem i njihovim naknadnim prijanjanjem na staničnu membranu uzrokovano elektrostatskom interakcijom. [46]



Slika 16. Djelovanje nanočestica bakra na stanice [45]

5.1. Mehanizmi djelovanja nanočestica metala na mikroorganizme

Metalne nanočestice pokazuju značajan potencijal kao antimikrobna sredstva te mogu pojačati učinke antibiotika ili same pružiti baktericidne učinke. Bakterije imaju ograničenu sposobnost razvijanja otpornosti na nanomaterijale zbog različitih mehanizama njihovog antibakterijskog djelovanja. To uključuje stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), otpuštanje metalnih iona, oštećenje bakterijskih membrana i staničnih stijenki te unutarstaničnih makromolekula poput proteina i DNA. Antimikrobna svojstva pripisuju se otpuštanju iona s površine metala bakra, bakrenog oksida i nanočestica, čija brzina ne ovisi samo o kemijskom sastavu materijala, već i o reaktivnim vrstama kisika i dušika (ROS i NS) koji nastaju. Nanočestice su također sposobne vezati se na bakterijske stanice elektrostatskim interakcijama i narušavanjem integriteta vanjske membrane, što dovodi do istjecanja unutarstaničnih komponenti i konačno smrti bakterijskih stanica. [43] Na Slici 17. prikazani su općeniti mehanizmi djelovanja metalnih nanočestica protiv bakterijskih stanica.



Slika 17. Općeniti mehanizmi metalnih nanočestica protiv bakterijskih stanica [44]

5.2. Oštećenje stanične membrane

Metalne nanočestice lijepe se za stanične stijenke i membrane nakon što su izložene bakterijama. Pozitivni površinski naboj metalnih nanočestica bitan je za pričvršćivanje. Negativno nabijena stanična membrana bakterija i pozitivno nabijene nanočestice elektrostatski se privlače, što olakšava prijanjanje metalnih nanočestica na stanične membrane jer su pozitivno nabijene u vodi. Nakon takve interakcije, morfološke promjene postaju očite i mogu se razlikovati po citoplazmatskom skupljanju i odvajanju membrane, što u konačnici dovodi do pucanja stanične stijenke. Osim elektrostatskog privlačenja, interakcija metalnih nanočestica s proteinima u staničnoj stijenci koja sadrži sumpor dovodi do nepovratnih promjena u strukturi stanične stijenke, što uzrokuje njeno uništenje. To zauzvrat ima utjecaj na propusnost stanične membrane i cjelovitost lipidnog dvosloja. Povećana propusnost membrane kao posljedica morfoloških promjena u stanicama utječe na njihovu sposobnost kontrole transportnih aktivnosti kroz staničnu membranu. [44]

5.3. Generiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)

Reaktivne kisikove vrste (ROS) prirodni su nusproizvodi staničnog oksidativnog metabolizma i igraju važnu ulogu u modulaciji preživljavanja stanica, stanične smrti, diferencijacije, stanične signalizacije i proizvodnje faktora povezanih s upalom. Biološki značajne reaktivne kisikove vrste uključuju slobodne radikale, kao što su singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksid (O_2^-), hidroksil (HO^\bullet), hidroperoksil (HO_2^\bullet), karbonat (CO_3^-), peroksil (RO_2^\bullet), alkoksil (RO^\bullet), i radikal ugljičnog dioksida (CO_2^\bullet), i neradikali, kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), hipobromna kiselina (HOBr), hipoklorna kiselina (HOCl), ozon (O_3), organski peroksidi (ROOH), peroksinitrit (ONOO^-), peroksinitrat (O_2NOO^-), peroksidušičasta kiselina (ONOOH), peroksomonokarbonat (HOOCO_2^-), dušikov oksid (NO) i hipoklorit (OCl^-). [47]

Pobuđivanje oksidativnog stresa reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) kroz uvođenje nanočestica općenito se opisuje kao nanotoksičnost nanočestica, a ova značajka također omogućuje da nanočestice budu smrtonosne za bakterijske stanice. ROS su vrsta doprinositelja ili induktora oksidativnog stresa, koja uključuje singletni kisik, peroksid, hidroksilne radikale i vodikov peroksid, što dovodi do oksidacije ili peroksidacije lipida, jezgri, proteina ili drugih biomolekula, što dovodi do disfunkcije staničnih procesa i na kraju uzrokuje bakterijsku smrt. ROS se također smatraju jednim od ključnih razloga za antibakterijske mehanizme nanočestica. ROS može oštetiti staničnu stijenku, ometati propusnost membrane i povećati gubitak pokretačke sile protona tako da stanice internaliziraju i preuzmu toksične nanočestice i njihove otpuštene agense. [43]

5.4. Inhibicija enzimskih sustava

Antibakterijski mehanizmi koje pokazuju metalne nanočestice su disfunkcija proteina i inhibicija enzima. Na primjer, Ag^+ primarno pokazuje antibakterijsko djelovanje kroz različite načine djelovanja, kao što je denaturacija 30-s ribosomske komponente i inhibicija sinteze proteina i enzima potrebnih za proizvodnju ATP-a putem oksidacije bočnih lanaca aminokiselina. $AgNP$ i Ag^+ ioni u interakciji s proteinima mijenjaju njihovu trodimenzionalnu strukturu, prekidaju disulfidne veze i blokiraju aktivna vezna mjesta, što uzrokuje funkcionalne probleme u mikroorganizmu. Nadalje, inhibicija fosforilacije proteina inhibirala njihovu enzimsku aktivnost, što zauzvrat rezultira inhibicijom rasta bakterija. Nanočestice imaju značajan potencijal za inaktivaciju uobičajenih aktivnosti ili metaboličkih procesa, kao što su propusnost, disanje i stvaranje energije, kod bakterijskih patogena. [44]

5.5. Nanočestice u okolišu

Nanočestice, ispuštanjem u okoliš, potencijalno bi mogle dovesti do rizika za ekosustave te je potrebno istražiti njihovu sudbinu, ponašanje i toksičnost u okolišu. Sve veća primjena nanočestica, kako kvantitativno, tako i u smislu raznolikosti proizvoda, dovodi do povećanja broja izvora emisija u okoliš. Nanočestica može ući u okoliš tijekom dugog životnog ciklusa i općenito se razmatraju tri scenarija emisije: ispuštanje tijekom proizvodnje

sirovina i nano-proizvoda, oslobađanje tijekom uporabe i otpuštanje nakon odlaganja proizvoda koji sadrže nanočestice. Emisije nanočestica mogu biti izravno u okoliš ili neizravno putem tehničkih sustava kao što su postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ili odlagališta. Neizravne emisije nastaju putem otpadnih voda iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, nanošenjem krutih organskih tvari u tlo ili iscjednih voda s odlagališta.

Nanočestice u okolišu podliježu procesima starenja kao što su kemijska transformacija, agregacija i dezagregacija. Međudjelovanje između ovih procesa i transporta nanočestica određuje sudbinu i konačno njihov ekotoksikološki potencijal.

Globalna procjena emisija nanočestica pokazuje da odlagališta (otprilike 63-91%) i tla (približno 8-28%) imaju najveći udio, a zatim slijede emisije u vodeni okoliš i zrak (7 odnosno 1,5%, od volumena proizvodnje). [10]

Zbog vrlo male veličine proizvedenih nanomaterijala, udisanjem se mogu potencijalno pojaviti čestice u zraku sastavljene od nanomaterijala koji pokrivaju raspon veličine od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara u promjeru.

Nanomaterijali se mogu aglomerirati u veće čestice ili duže lance vlakana, što može promijeniti njihova svojstva i utjecati na njihovo ponašanje u unutarnjem i vanjskom okruženju, kao i na njihovu moguću izloženost i ulazak u ljudsko tijelo. Mogu se taložiti u dišnom sustavu i imaju toksičnost pod utjecajem nanostrukture zbog velike površine, visoke površinske aktivnosti, neobične morfologije, malih promjera ili razgradnje u manje čestice nakon taloženja.

Čestice nastale razgradnjom ili usitnjavanjem nanomaterijala također mogu predstavljati potencijalni rizik ako pokazuju biološku aktivnost ovisnu o nanostrukтури. Nanočestice imaju visoku učinkovitost taloženja u plućima zdravih osoba, a još veću učinkovitost kod osoba s astmom ili kroničnim opstruktivnim plućnim bolestima. [48]

5.6. Smjerovi istraživanja u primjeni nanočestica u medicini

Nanomedicina je područje znanosti i tehnologije širokog spektra koje ujedinjuje višestruke tokove medicinskih primjena kao što su liječenje i dijagnoza bolesti, prevencija bolesti, tehnologije za ublažavanje boli, medicina za poboljšanje ljudskog zdravlja, nanotehnologija protiv traumatskih ozljeda i mogućnosti liječenja bolesti. [49] Jedan od ciljeva nanotehnologije je izgradnja strojeva za popravak veličine bakterije. Oni mogu ući u stanice i izaći iz njih, uništiti uljeze u krvnim žilama, pa čak i provjeravati pogreške u DNK. Biotehnologija s nanoznanošću omogućit će ne samo iskorištavanje prednosti poboljšanih evolucijskih bioloških komponenti za generiranje novih pametnih senzora, već i primijenu današnje napredne tehnike karakterizacije i izrade za rješavanje ekoloških i bioloških problema.

Nanotehnologija raka je interdisciplinarno područje istraživanja u znanosti, inženjerstvu i medicini sa širokom primjenom za molekularno oslikavanje, molekularnu dijagnozu i ciljanu terapiju. Osnovno obrazloženje je da čestice nanometarske veličine, kao što su poluvodičke kvantne točke i nanokristali željeznog oksida, imaju optička, magnetska ili strukturna svojstva koja nisu dostupna kod molekula ili rasutih krutih tvari. Kada se povežu s ligandima za ciljanje tumora kao što su monoklonska protutijela, peptidi ili male molekule, ove se nanočestice mogu koristiti za ciljanje tumorskih antigena kao i tumorskih vaskulatura s visokim afinitetom i specifičnošću. [48]

Nanotehnologija ima potencijal revolucionirati područje zdravstvene dijagnostike poboljšanjem točnosti, osjetljivosti i brzine medicinskih testova. Jedna od značajnih primjena uključuje dijagnostičko oslikavanje temeljeno na nanočesticama, u kojem se nanočestice mogu pričvrstiti na specifične biomarkere kako bi se poboljšali modaliteti oslikavanja kao što su magnetska rezonancija (MRI), kompjuterizirana tomografija (CT) i pozitronska emisijska tomografija (PET), čineći ih osjetljivijima, točnijima i specifičnijima. [48] Jedan od ključnih smjerova u istraživanju nanomedicine za budućnost bit će kombiniranje nanočestica s molekulama, terapijskim lijekovima ili inter-nanočesticama kako bi se poboljšala stabilnost, terapijski učinci i smanjili toksični učinci nanolijekova. [50]

Nanotehnologija u budućnosti ima stoga ogroman potencijal u zdravstvu i medicini u dijagnostici, liječenju te sprječavanju bolesti. Nanomaterijali zbog svoje male veličine imaju

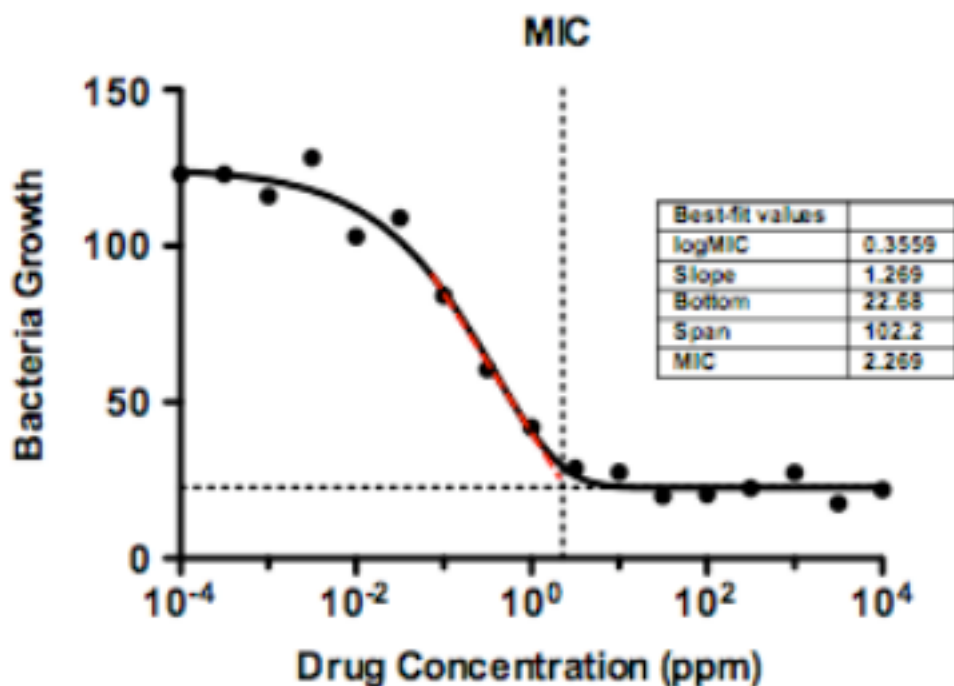
preciznu kontrolu fizičkih, kemijskih i bioloških svojstava što omogućuje razvijanje novih terapija, lijekova i dijagnostičkih alata.

6. Metode određivanja efikasnosti mikrobne zaštite

Metode određivanja efikasnosti mikrobne zaštite važan su korak u razvoju novog antimikrobnog materijala. Da bi se materijal definirao kao antimikrobni, učinkovitost bi se trebala procijeniti u ponovljivim uvjetima koji oponašaju uvjete okoline. Kako bi se potvrdila ponovljivost antimikrobnog materijala, nekoliko različitih laboratorija treba provesti standardiziranu metodu ispitivanja i postignuti rezultate koji su svi unutar raspona pogreške za takvo ispitivanje. Uvjeti okoliša, kao što vlaga, protok zraka, temperatura, mogu bitno promijeniti učinkovitost antimikrobne zaštite nekog materijala te ih je bitno uzeti u obzir prilikom razmatranja učinkovitosti antimikrobne zaštite. Postoji pet općih kategorija ispitivanja za antimikrobni materijala in vitro: testovi omjera površine i volumena, testovi inhibicije agar zone, testovi suspenzije, testovi adhezije i biofilm testovi. [51]

Utvrđeno je da je osjetljivost mikroba na nanostrukture izrazito različita, ovisno o mikrobnj vrsti i eksperimentalnom sustavu. Različite metode koje su korištene za testiranje antimikrobne aktivnosti bakrenih nanomaterijala navedene su kako slijedi: test difuzije diska je definirao zonu inhibicije (ZOI), minimalnu inhibicijsku koncentraciju (MIC), minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBC) i brojanje kolonija - formiranje jedinica. MIC se definira kao najniža koncentracija materijala koji inhibira rast organizma; dok se MBC definira kao najniža koncentracija materijala koja inhibira rast organizma u šaržnim kulturama, to se može odrediti iz MIC testova razrjeđenja bujona subkultiviranjem u agarni medij bez antibiotika. [42]

Osjetljivost i otpornost mjere se minimalnom inhibicijskom koncentracijom (MIC) (Slika 13.). MIC se definira kao minimalna koncentracija antibiotika za inhibiciju rasta bakterija. MIC se obično određuje izlaganjem određene količine bakterijske populacije nizu rastućih koncentracija antibiotika u standardiziranom mediju za rast oko 16-20 h. [32]



Slika 18. Grafički prikaz MIC-a potrebnog za inhibiciju rasta bakterija [52]

Nijedna pojedinačna metoda ne može se smatrati najboljom, jer čimbenici kao što su dostupnost opreme, volumen uzorka i priroda agensa koji se testira utječu na izbor metode. Koristi se kombinacija više metoda ili nadopunjavanje postojećih kako bi se povećala točnost i pouzdanost određivanja antimikrobne zaštite. Prilagođavanjem odabira metoda specifičnim potrebama i optimiziranjem postojećih tehnika u skladu s tim, postiže se odgovarajuća ravnoteža između jednostavnosti i osjetljivosti u metodama ispitivanja. Određivanje učinkovitosti antimikrobne zaštite igra veliku ulogu u razvijanju novih učinkovitih antimikrobnih sredstava što u konačnici doprinosi napretku u borbi protiv antimikrobne rezistencije.

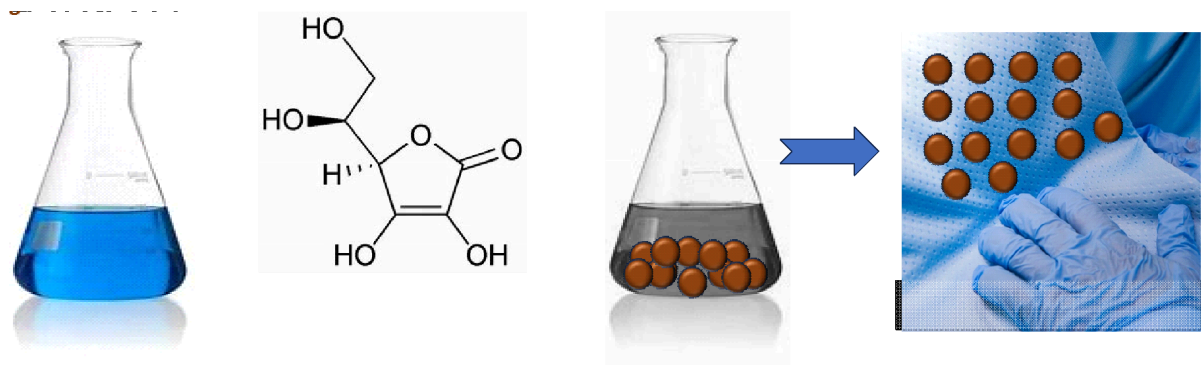
7. EKSPERIMENTALNI DIO

7.1. Materijali i metode

Prilikom sinteze nanočestica bakra korištene su sljedeće kemikalije:

- bakrov sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $c=1 \text{ M}$
- askorbinska kiselina, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, $c=1,2 \text{ M}$
- natrijev hidroksid, NaOH , $c=2 \text{ M}$
- polivinilpirolidon (PVP)

Dobivene čestice učvršćene su u antimikrobnu prevlaku korištenjem sol-gel metode te su provedene daljnje analize. Metode korištene za karakterizaciju česticu su Raman, FTIR, NMR, UV-VIS, DLS te su promatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom kako bi se pratila morfološka svojstva dobivenih čestica.

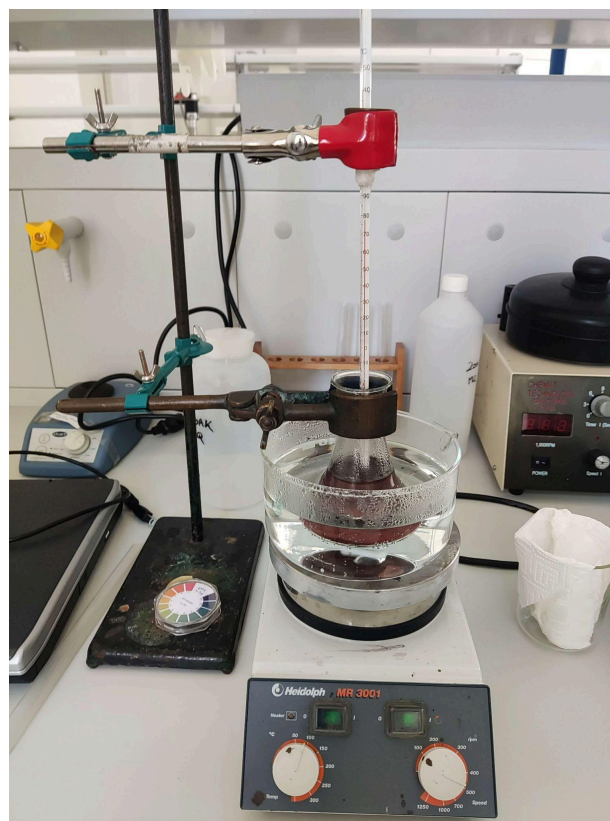


Slika 19. Nanočestice bakra dobivene reakcijom s askorbinskom kiselinom i primijenjene na medicinske materijale pomoću sol-gel postupka.

7.2. Priprema nanočestica i učvršćivanje u antimikrobnu prevlaku

Nanočestice bakra dobivene su postupkom redukcije bakrovog(II)sulfata pentahidrata u reakciji s askorbinskom kiselinom. Otopina bakrova(II)sulfata pentahidrata pripremljena je

otapanjem 2,5 g u 10 mL deionizirane vode kako bi se dobila otopina koncentracije 1 M. 2,11 g askorbinske kiseline otopljeno je u 10 mL deionizirane vode te je koncentracija dobivene otopine iznosila 1,2 M te su obje otopine međusobno promiješane. Kako nebi došlo do aglomeracije dobivenih čestica bakra u otopinu je dodan zaštitni polimer, polivinilpirolidon (PVP). Otopina PVP-a je dobivena otapanjem 2 g polimera u 10 mL vode. U dobivenu otopinu dodan je NaOH ($c=2$ M) kako bi pH-vrijednost iznosila između 11 i 12. Otopina je potom zagrijana na 80°C na magnetskoj miješalici uz neprestano miješanje 1 h tijekom čega je otopina promijenila boju od žute prema smeđoj (Slika 20.). Nakon završetka reakcije, otopina je uklonjena s topline i ostavljena da se slegne preko noći. Otopina je potom filtrirana kroz filter papiru te su čestice koje su se zadržale na filter papiru gledane pod optičkim mikroskopom, a na ostatku otopine su provedene daljne analize te su čestice učvršćene u antimikrobnu prevlaku sol-gel metodom.



Slika 20. Otopina bakrovog(II)sulfata i askorbinske kiseline na magnetskoj miješalici

Homogenizirane smjese prekursora GLYMO reagensa i Cu nanočestica izlijevane su u teflonske posude, a zatim su uzorci biorazgradivih biokompatibilnih polikaprolaktona uranjeni pomoću aparature za uranjanje (Slika 21.) definiranom brzinom uranjanja/izranjanja te ostavljeni da geliraju pri sobnoj temperaturi tijekom 24 h. Na taj način se omogućila hidroliza alkoksidnih skupina GLYMO-a sa vlagom iz zraka, a nakon toga su uzorci sušeni pri 100 °C, 1 h. Prevlake su izvlačene brzinom od 1 mm/s, kako bi se dobile što tanje dimenzije površinskog sloja prevlake.



Slika 21. Aparatura za uranjanje vlastite izrade, (Zavod za materijale, vlakna i ispitivanje tekstila, TTF)

Homogenizacija otopine postiže se ultrazvučnim miješanjem (frekvencija, vrijeme, medij). Ultrazvučno homogeniziranje je mehanički postupak smanjenja malih čestica u tekućini na način da one postanu jednoliko raspoređene. Ultrazvuk se primjenjuje u svrhu homogenizacije zato što pospešuje miješanje i mućkanje uzoraka pri čemu ne dolazi do značajnih promjena kemijskih karakteristika uzorka koji se tretira ultrazvukom. Ultrazvučna obrada provedena je u ultrazvučnoj kadi Elmasonic P proizvođača Elma.

7.3. Instrumentalne metode analize

7.3.1. Raman-FTIR-NMR

BRUKER EQUINOX 55 FT-IR/FT-RAMAN spektrometar bio je opremljen interferometrom s Raman modulom FRA 106/S i Nd laserom (1064 nm), spektralnim rasponom za IR (NIR: 15000–4000 cm^{-1} ; MIR: 4000–400 cm^{-1}) i za Raman (3500–400 cm^{-1}), te dodatnom opremom: držačima i ćelijama za krute, tekuće i plinovite uzorke, grijačem i ćelijama za mjerenje spektara ovisnih o temperaturi, opremom za mjerenje tehnikama atenuirane totalne refleksije (ATR) i difuzne refleksije (DRIFT), te optičkom sondom za in situ mjerenja.



Slika 22. Raman/ FTIR-ATR spektrometar

7.3.2. NMR

Korišteni NMR spektrometar bio je Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend s Ascend™ 9,4 T magnetom, 5 mm inverznom BBI sondom sa Z-gradijentom i ATM

jedinicom (model PA BBI 1H/D-BB Z), 5 mm direktnom BBO CryoProbe Prodigy sondom (model CPP BBO 400S1 BBH&F-D-O5 Z) sa Z-gradijentom, ATM jedinicom i pripadajućom opremom potrebnom za hlađenje elektronike sonde tekućim dušikom, sustavom za kontrolu temperature (VTU), BCU-I jedinicom za hlađenje, opremom za mjerenja pri niskim temperaturama i sustavom automatizacije uzoraka SampleCase.



Slika 23. NMR Bruker Avance III HD 400 MHz/54

7.3.3. UV-VIS

Spektrofotometar Lambda 20, Perkin Elmer, dvoznačni s monokromatorom optičkom mrežicom. Radno područje od 190 nm-1100 nm, s dva izvora elektromagnetskog zračenja

(halogena i deuterijeva lampa) i fotodiodom kao detektorom korišten je u svim mjerenjima uz vodu kao referentni uzorak.

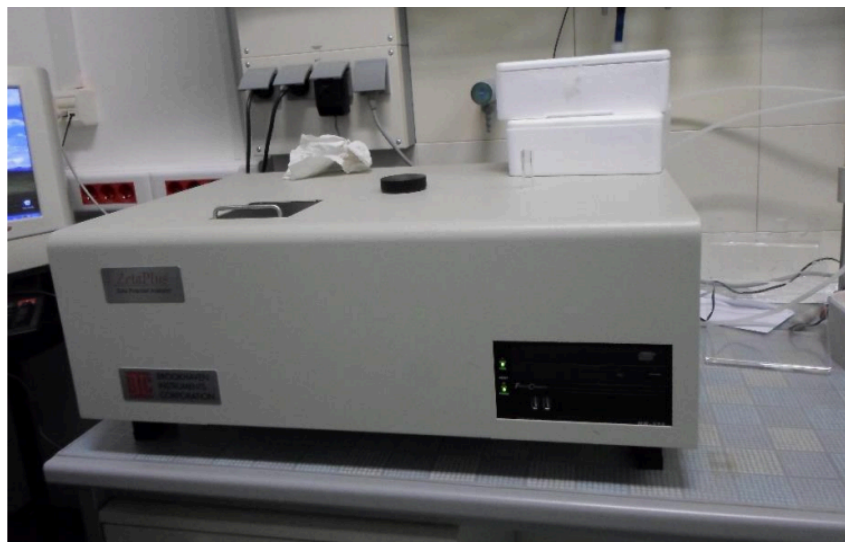


Slika 24. UV-VIS Lamda 20, Perkin Elmer spektrometar

UV-VIS dvosnopni spektrometar je instrument koji se koristi za analizu apsorpcije ultraljubičastih (UV) i vidljivih (VIS) svjetlosnih valnih duljina u uzorcima. Ovaj tip spektrometra omogućava simultano mjerenje svjetlosti koja prolazi kroz uzorak i referentnu stanicu, čime se povećava točnost i preciznost mjerenja. Dvosnopni spektrometri obično koriste monokromatore za selekciju specifičnih valnih duljina svjetlosti, a detektori, poput fotodioda ili fotomultiplier cijevi, bilježe intenzitet prolazne svjetlosti. Ova tehnologija omogućava analizu raznih kemijskih spojeva, kao i određivanje njihove koncentracije na temelju Beer-Lambertovog zakona, koji opisuje odnos između apsorpcije i koncentracije. UV-VIS spektrometrija našla je široku primjenu u različitim područjima, uključujući analitičku kemiju, biokemiju, farmaceutsku industriju i okolišne znanosti, zahvaljujući svojoj sposobnosti pružanja brze i pouzdane informacije o svojstvima uzoraka.

7.3.4. DLS

Instrument za mjerenje elektrokinetičkog potencijala i dinamičkog raspršenja svjetlosti Brookhaven ZetaPlus, Brookhaven ZetaPlus, služi za određivanje elektrokinetičkog potencijala čestica u razrijeđenim otopinama i mjerenje veličine čestica pomoću dinamičkog raspršenja svjetlosti u razrijeđenim otopinama.



Slika 25. DLS, iz https://www.chem.pmf.hr/images/50021164/PMF_Katalog_znanstvene_opreme_i_racunasnih_programa.pdf

DLS (dinamička svjetlosna raspršenost) spektrometar je instrument koji se koristi za mjerenje veličine čestica u suspenzijama i emulzijama na temelju analize raspršenog svjetla. Ova tehnika temelji se na Brownovom kretanju čestica, pri čemu se prolazna svjetlost, obično laserska, raspršuje od čestica u suspenziji. DLS spektrometar mjeri fluktuacije u intenzitetu raspršenog svjetla tijekom vremena, što omogućava određivanje brzine kretanja čestica i, posljedično, njihove veličine. Jedna od glavnih prednosti DLS-a je njegova sposobnost brze analize velikog broja uzoraka s visokom točnošću. DLS se često koristi u istraživanju i razvoju nanomaterijala, bioloških uzoraka, farmaceutskih formulacija i u kontroli kvalitete, jer omogućuje dobivanje informacija o raspodjeli veličine čestica, stabilnosti disperzija i interakcijama između čestica. DLS spektrometri su neinvazivni i mogu raditi s uzorcima u različitim medijima, uključujući otopine, gelove i praškaste materijale.

7.3.5. SEM-EDX

Skenirajući elektronski mikroskop "TESCAN VEGA TS5136LS" s EDX detektorom korišten je za praćenje morfologije uzorka i određivanje glavnih sastojaka uzorka. Instrumentalni parametri SEM-EDS-a bili su: radna udaljenost od 25 mm, energija od 20 eV, povećanje od 1000 do 10.000 puta, korišteni detektori su bili za raspršene i sekundarne elektrone, s vremenom prikupljanja od 30 s. Operativni parametri Sputter Coatera SC 7620 korištenog za prevlačenje uzoraka tankim slojem Au/Pd bili su: snaga od 230 V (12 A), Au/Pd meta, udaljenost mete 45 mm, izlazna snaga napajanja 800 V, rezolucija 15 s, brzina crpljenja 25 L/min, brzina napanavanja 6 nm/min, debljina prevlake 1–20 nm, uniformnost prevlake >10%, medij za napanavanje Ar.

Površinska struktura i morfološke karakteristike nemodificiranih i modificiranih uzoraka snimane su na skenirajućem elektronskom mikroskopu proizvođača TESCAN-VEGA. Snimanja su provedena uz povećanje od 80x, 500x, 2000x i 5000x a uzorci su napareni napanivačem sa zlatom/paladijem (Au/Pd) kako bi se postigle što bolje snimke morfologije pripremljenih sol-gel prevlaka.



Slika 26. Skenirajući elektronski mikroskop

7.4. Antimikrobna ispitivanja

Antimikrobna aktivnost Cu nanočestica nanesenih na elektroispredena vlakna i pređu procijenjena je korištenjem nekoliko različitih modelnih mikroorganizama: *E. Coli*, *E. faecalis*, *K. Pneumoniae*, *P. Aeruginosa* i *S. aureus*. Prvo je proveden difuzijski test na agaru, nakon čega je uslijedio test serijske mikrodilucije u bujonu. Difuzijski test na agaru proveden je prema smjernicama Europske farmakopeje te na temelju naših prethodnih istraživanja. Za potrebe ove studije inokulumi su pripremljeni od svježih noćnih kultura bakterija. Nakon što je bakterijska suspenzija bila spremna, uzorci su aplicirani u rupe na agar pločama u volumenu od 50 μ L. Prije inkubacije, ploče su predinkubirane na +4 °C jedan sat. Zatim su inkubirane na +37 °C 18 sati u aerobnim uvjetima, pri čemu se osiguravalo da okoliš ostane tamno tijekom cijelog procesa. Antimikrobna aktivnost zatim je ocijenjena mjerenjem promjera zona inhibicije rasta oko rupa.

Test minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) mjeri najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa potrebnu za inhibiciju vidljivog rasta bakterija u tekućem mediju. Provođi u mikropločama u kojima se bakterije kultiviraju s različitim koncentracijama ispitivane tvari. Pri tome, vrijednost minimal inhibitory concentration, MIC predstavlja najmanju koncentraciju koja ne pokazuje znakove rasta bakterija, što u praksi omogućava određivanje minimalne količine nanočestica potrebne za učinkovito suzbijanje bakterija.

Druga metoda određivanja antimikrobne učinkovitosti je metoda difuzije, kod koje se diskovi natopljeni antimikrobnim nanočesticama postavljaju na agar ploče inokulirane bakterijama. Nakon provedene interakcije nanočestica i mikroorganizama, izmjeri se promjer zone inhibicije (u mm) oko diskova kako bi se odredila učinkovitost agensa; pri tome kod rezultata kod kojega je veći promjer radijusa zone inhibicije ukazuje na veću aktivnost agensa protiv bakterija. Ova metoda se rutinski koristi u mikrobiološkim laboratorijima za testiranje antibiotika na različitim sojevima bakterija i pruža brze rezultate o osjetljivosti bakterija na određene tvari.

8. REZULTARI I RASPRAVA

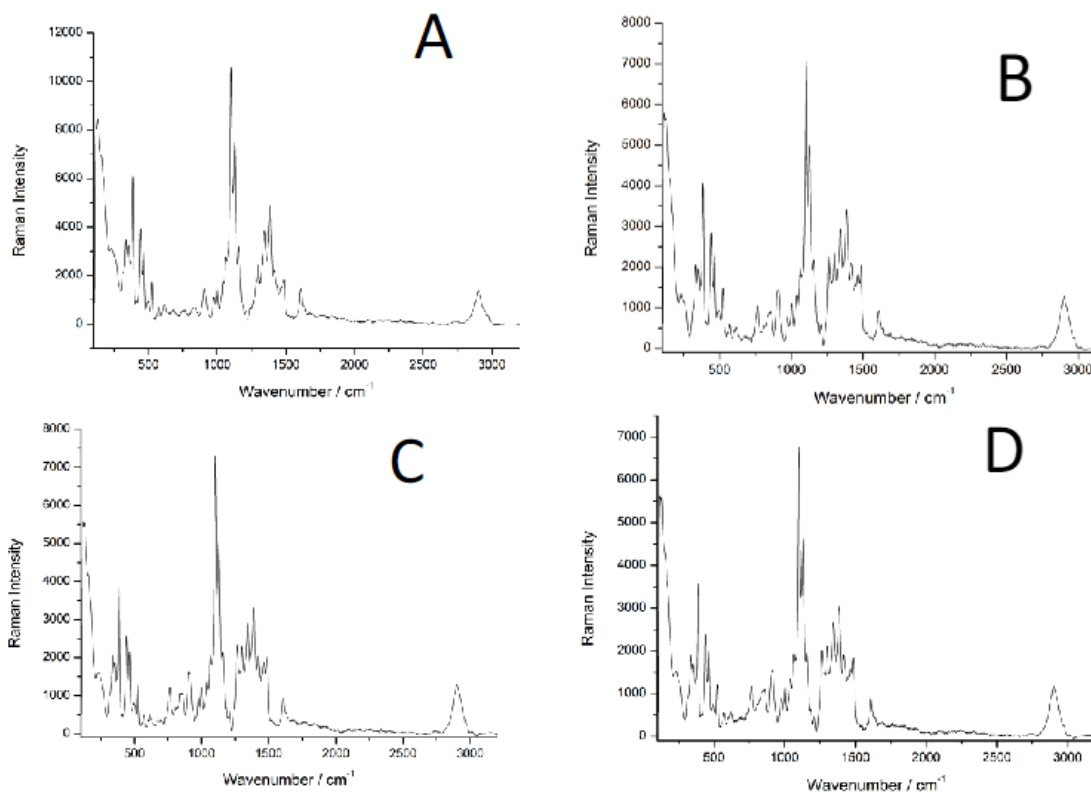
8.1. Sol-gel postupci u pripremi uzoraka

Sol-gel metoda odabrana je za nanašanje nanočestica bakra na biorazgradive polimere jer je to vrlo učinkovita tehnika koja se često koristi za funkcionalizaciju površine radi mnogobrojnih prednosti, poput mogućnosti stvaranja homogenih i stabilnih premaza na različitim površinama. Ova metoda temelji se na pretvorbi tekućeg sol-gel sustava u čvrstu gel strukturu, koja može uključivati nanočestice bakra kao aktivne antimikrobne komponente. Sol-gel proces započinje pripremom prekursora, najčešće alkoksida metala, koji se otapaju u odgovarajućem otapalu, kao što je etanol ili voda. Nakon dodavanja katalizatora, obično kiseline ili baze, dolazi do reakcija hidrolize i kondenzacije, čime se stvara trodimenzionalna mreža koja inkapsulira nanočestice bakra.

Jedna od glavnih prednosti sol-gel metode je mogućnost kontroliranja sastava i strukture konačnog materijala, što omogućava ravnomjernu disperziju nanočestica unutar matrice. Ovaj proces se može provesti pri niskim temperaturama, što je posebno pogodno za osjetljive materijale poput polimera ili biokompatibilnih supstrata. Osim toga, sol-gel metoda omogućava modificiranje površinskih svojstava materijala, kao što su poroznost i kemijska aktivnost, što dodatno poboljšava antimikrobna svojstva prevlake.

Nanočestice bakra poznate su po svojim snažnim antimikrobnim svojstvima, koja su posljedica sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), interakcije s mikrobnom staničnom membranom te oštećenja DNA i proteina unutar mikroorganizama. Kada su inkorporirane u sol-gel matricu, nanočestice bakra ostaju stabilne i postupno oslobađaju svoje aktivne komponente, čime se osigurava dugotrajna antimikrobna zaštita. Ovakve prevlake mogu se koristiti za razne primjene, uključujući medicinske uređaje, zavoje za rane, zaštitne premaze za površine koje dolaze u kontakt s hranom te za tekstilne materijale u zdravstvenim ustanovama. Stoga je u ovom radu sol-gel metoda odabrana za učinkovito stvaranje antimikrobnih prevlaka s učvršćenim nanočesticama bakra. Ovaj proces omogućio je preciznu kontrolu nad strukturom i kemijskim sastavom prevlake, pružajući visoku učinkovitost i stabilnost u suzbijanju mikroorganizama, te široku primjenjivost u različitim područjima. Kako bi se postojanost prevlake te njene fizikalno-kemijske i mehaničke karakteristike istražile, korišteno je nekoliko spektroskopskih i mikroskopskih metoda.

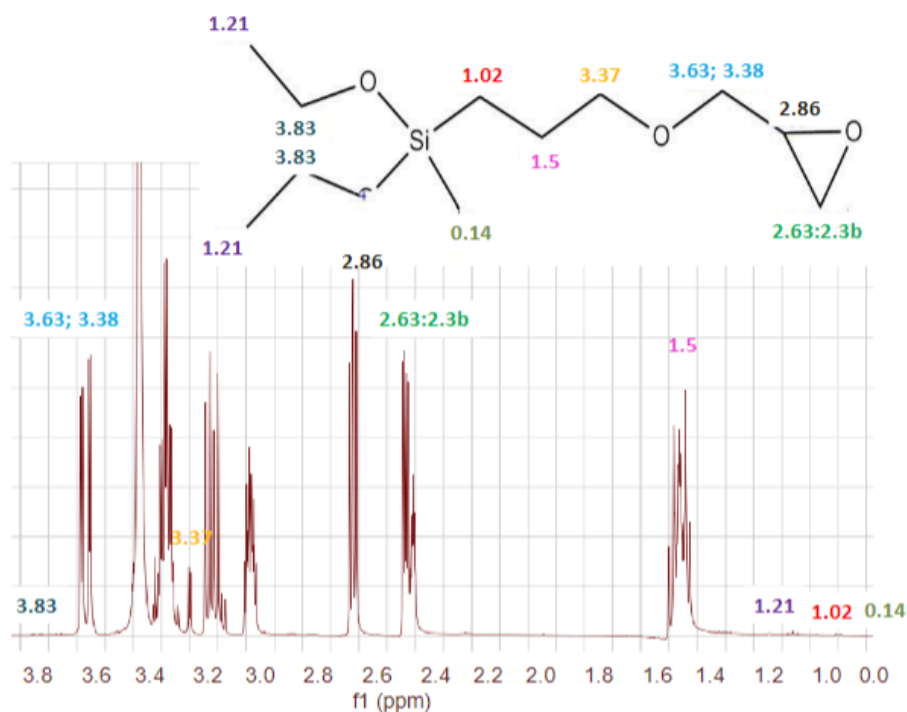
8.2. Raman, FTIR i NMR spektroskopija



Slika 27. Raman spektri 500 – 3500 cm^{-1} (A – čisti polimer, B - polimer + GLYMO, C - polimer + GLYMO+ NPs, D - polimer + GLYMO+ NPs

Slike 27A, 27B i 27C prikazuju Ramanove spektre nemodificiranog uzorka te uzorka modificiranih GLYMO-m, s nanočesticama i GLYMO s nanočesticama i sa katalizatorom. Široki vrh označen zelenim krugom, centriran oko 300 cm^{-1} , ukazuje na prisutnost SiO_2 funkcionalne skupine. Zanimljive su vidljive promjene u spektrima uzorka prije i nakon modifikacije jer se tako mogu uočiti formirane nove veze: epoksi skupine prije sol-gel modifikacije pojavljuju se oko ~ 905 i 910 cm^{-1} , dok se područje oko 1100 cm^{-1} nakon modifikacije može povezati s Si–O skupinama, posebice Si–O–C i Si–O–Si mostovima. Također, dolazi do konverzije metoksi skupina prekursora GLYMO, što se može pratiti pri $\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$. Iz toga se može zaključiti da Ramanovi spektri uzorka prije i nakon funkcionalizacije pokazuju značajne razlike. Međutim, nije bilo razlike u spektrima uzorka modificiranih s katalizatorom i bez njega.

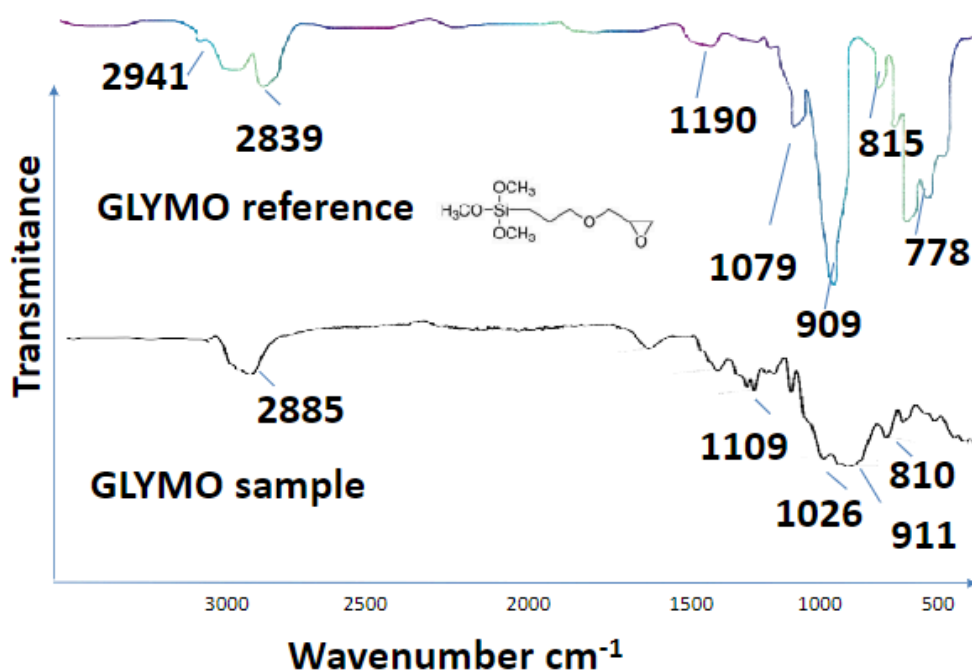
Kiseli katalizatori, poput HCl, značajno utječu na sol-gel proces, jer hidroliza rezultira homogenom hibridnom strukturom. U predloženoj reakciji, prekursor GLYMO reagira u reakcijama hidrolize i kondenzacije, pri čemu dolazi do otvaranja alkoksidnih skupina i epoksi prstena. Stoga se može zaključiti da je ovaj prekursor bio dobar početni materijal za stvaranje hibridnih materijala s kovalentnim vezama između organskih i anorganskih faza. Nadalje, vrsta mreže formirane tijekom polimerizacije snažno ovisi o vrsti katalizatora korištenog u reakciji: katalizator modificira reaktivnost organskog dijela GLYMO-a te se staklasta struktura dobiva samo kada dolazi do otvaranja epoksi prstena GLYMO-a (Slika 28).



Slika 28. Spektri nuklearne magnetske rezonance ^1H (^1H NMR) na 400 MHz čistog prekursora GLYMO pripremljenog za elektrokonstruirani uzorak. Promatra se ^1H - ^{13}C spajanje, dok su vrhovi c^* ($\delta = 3.83$ ppm) i c^{**} ($\delta = 3.38$ ppm) prisutni, a njihova intenzitet raste s brojem ponavljajućih jedinica. Oznake funkcionalnih grupa odnose se na one u kemijskoj strukturi prikazanoj u donjem desnom kutu prema predviđenom modelu.

FTIR spektar reagensa GLYMO, tj. epoksi-propoksid -propil-trimetoksi-silan, ili glicidil 3-(trimetoksisilil)-propil eter) prizana je na slici 28 te sadrži slijedeće pikove: asimetrično

C-O-C rastezanja koji se pojavljuje od 950–810 zabilježeno je na 910 cm^{-1} . Epoksidi su karakterizirani tročlanim prstenom sastavljenim od dva atoma kisika i jednog atoma ugljika. Njihovi spektri obično prikazuju tri vrha, koji odgovaraju rastezanju i kontrakciji veza unutar ovog prstena, javljajući se unutar raspona od 1280–1230, 950–810 i 880–750. Osobito su istaknuta posljednja dva pika. Praćenje magnitude ovih pikova omogućuje praćenje procesa modifikacije epoksidne smole. Spektar GLYMO bio je identificiran po Si-O-C trakama na 1200-1000 cm^{-1} i vrhovima oksirane prstenaste strukture na 910 cm^{-1} (također na 3047).



Slika 29. FTIR rezultati prekursora GLYMO dobiveni nakon analize reagensa korištenog u ovom istraživanju (donja, tanka crna linija) i u usporedbi s FTIR spektrom zabilježenim u literaturi (gornja, debela obojena linija) [39].

Simetrično istežanje C-O-C, gdje se dva C-O ugla streću dok se C-C ugla skuplja, zabilježeno je na 810 cm^{-1} . Ostali pikovi zabilježeni su na 778 cm^{-1} , potječu od C-H; jak, oštar vrh na 1024,9 cm^{-1} odnosi se na istežanje C-O/O-H deformaciju; vrh na 1075 cm^{-1} potječe od istežanja C-C; 1109 cm^{-1} je istežanje C-O na C3; 2839 cm^{-1} povezan je s CH od CH₃, CH₂, CH, a pikovi na 2885 cm^{-1} i 2941 cm^{-1} povezani su s alifatskim CH CH₃; apsorpcijski pojas

na 2912 cm^{-1} do 2986 cm^{-1} karakterističan je za istežanje C-H; pored toga, izvorni spektri sadržavali su širok pojas na 3200 cm^{-1} - 3485 cm^{-1} karakterističan za istežanje O-H, koji proizlazi iz intermolekularnih i intramolekularnih vodikovih veza.

I referentni uzorak i uzorak korišten u modifikaciji imali su iste vrhove koji su povezani s karakterističnim funkcionalnim skupinama. Važno je napomenuti da varijacije u kvaliteti materijala prekursora mogu značajno utjecati na učinkovitost krajnjeg proizvoda. Pojas oko 1600 cm^{-1} u FTIR spektru GLYMO reagensa najvjerojatnije se javlja zbog savijajućih vibracija adsorbirane vode (H-O-H savijanje). GLYMO sadrži metoksilne skupine koje se mogu hidrolizirati u silanolne skupine, koje lako adsorbiraju vodu iz okoline. To je uobičajeno za silane koji su izloženi uvjetima okoline gdje vlaga može biti prisutna. Hidroksilne skupine koje proizlaze iz djelomične hidrolize metoksilnih skupina također bi mogle pridonijeti ovom pojasu.

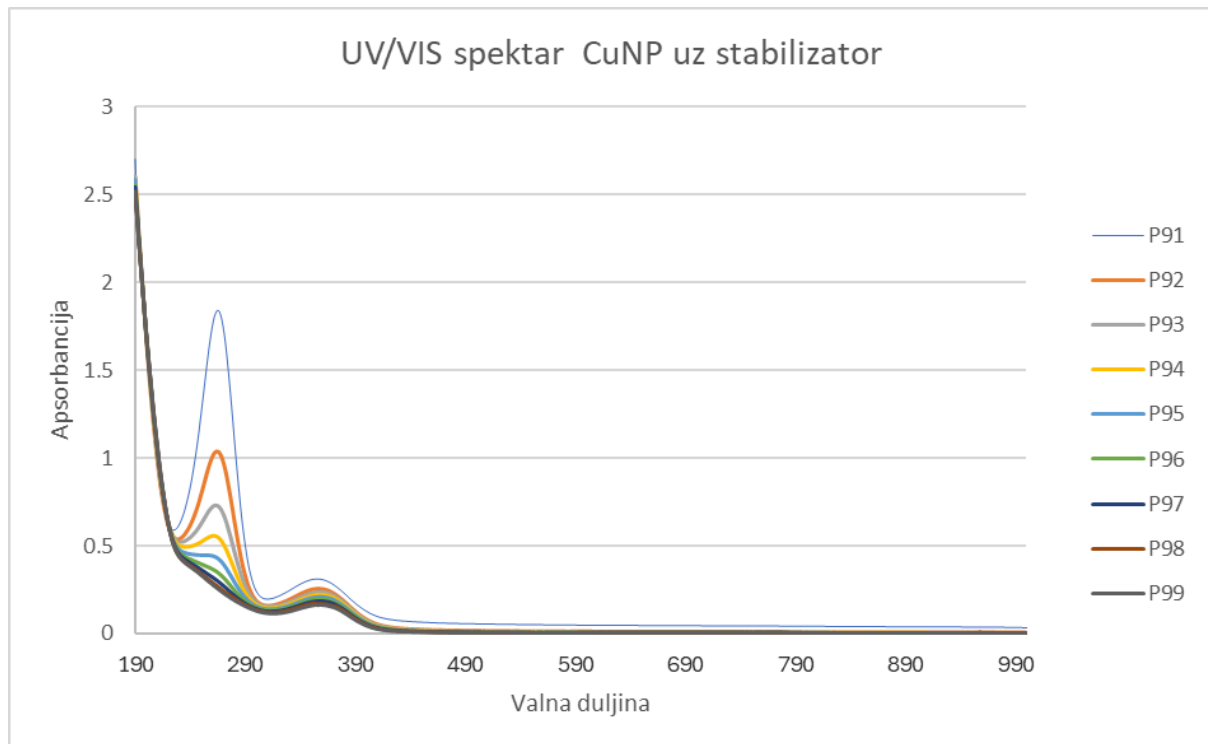
Daljnja bi analiza mogla razmatrati i druge pojaseve u FTIR spektru kako bi potvrdila da nijedna druga funkcionalna skupina nije prisutna. Ostala moguća pripisivanja za pojas na 1600 cm^{-1} u GLYMO mogli bi biti: a) istežanje C=C aromatskih prstenova ili konjugiranih sustava, što je manje vjerojatno za čisti GLYMO, koji inherentno ne sadrži aromatske prstenove. Drugo, u prisutnosti aaminskih funkcionalnih skupina ili u slučaju da je GLYMO reagirao s spojima koji uvode aminske skupine, vibracije NH_2 skupina mogle bi se pojaviti oko ovog područja. Međutim, u čistom reagensu, to je također vrlo malo vjerojatno. Stoga je pretpostavka bila da je došlo do apsorpcije molekula vode, što je uzrokovalo ovu promjenu u FTIR spektarima.

8.3. UV-VIS

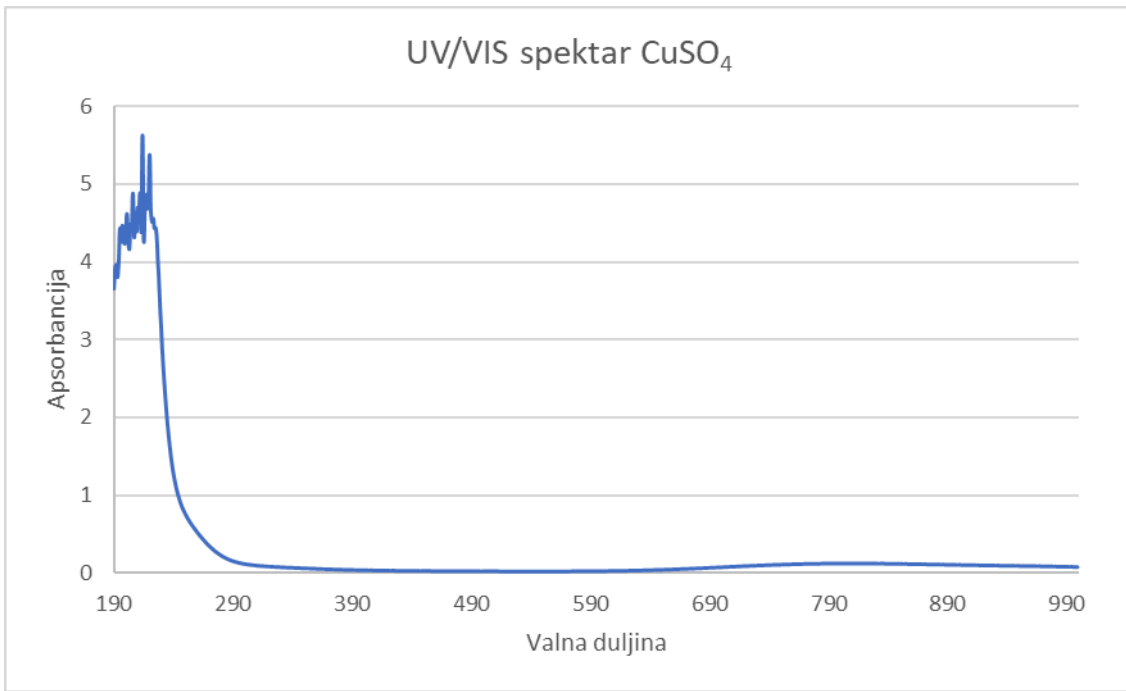
UV-VIS spektri omogućuju praćenje apsorpcije energije čistih reagenasa prije reakcije nastajanja nanočestica, kao i praćenje reakcijskih produkata nakon što je reakcija krenula.

U ovom je radu praćena reakcija u vremenu do 60 minuta, a rezultati su prikazani na slikama 30 – 33.

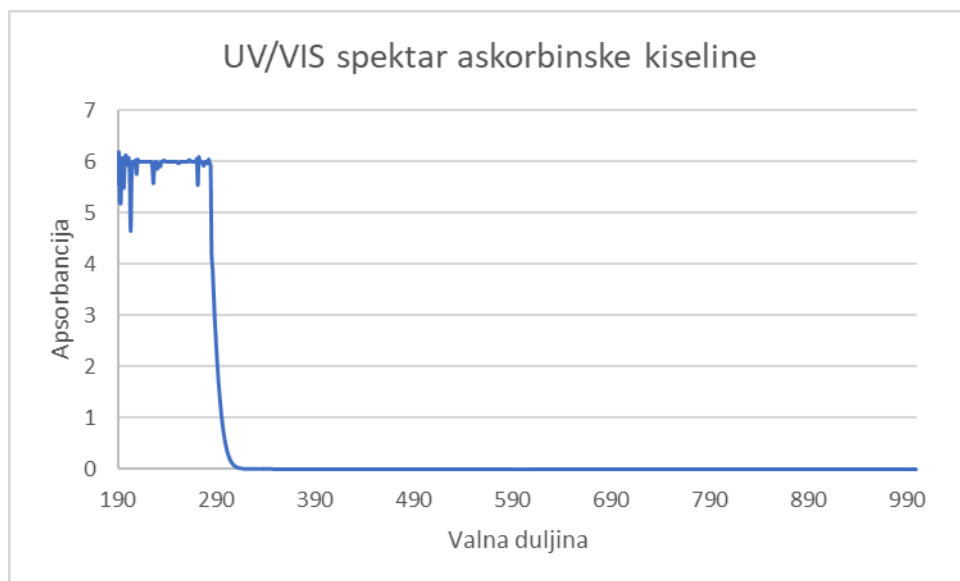
Rezultati UV-Vis analize interpretiraju se promatranjem spektra apsorpcije tvari poznatih koncentracija. Vrhovi se identificiraju prema njihovoj valnoj duljini, a njihov intenzitet može pružiti informacije o koncentraciji nanočestica. Na primjer, povećanje intenziteta vrhova može ukazivati na povećanje koncentracije nanočestica u otopini. Osim toga, pomaci u vrhovima mogu sugerirati promjene u veličini ili obliku čestica uslijed aglomeracije ili drugih interakcija.



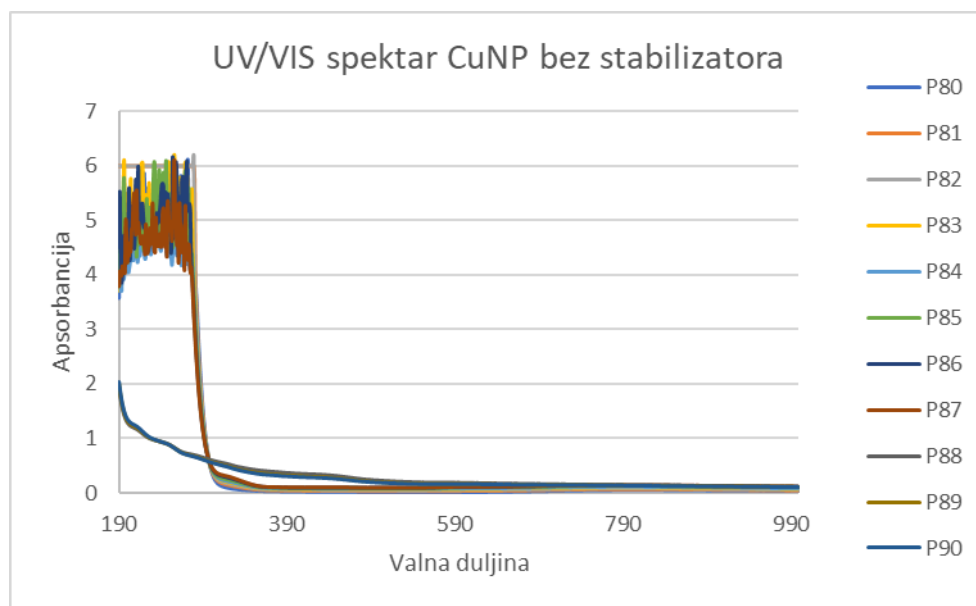
Slika 30. UV-VIS spektr uzorka nanočestica bakra dobivenih uz stabilizator



Slika 31. UV-VIS spektar uzorka bakrovog sulfata prije reakcije nastajanja nanočestica



Slika 32. UV-VIS spektar uzorka askorbinske kiseline prije reakcije



Slika 33. UV-VIS spektar uzorka nanočestica bakra bez stabilizatora

Kao što se može vidjeti iz spektra uzorka nanočestica koje su dobivene i sintetizirane pomoću askorbinske kiseline bez stabilizatora, kod krivulja se uočava veliki šum koji onemogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu koncentracija nanočestica.

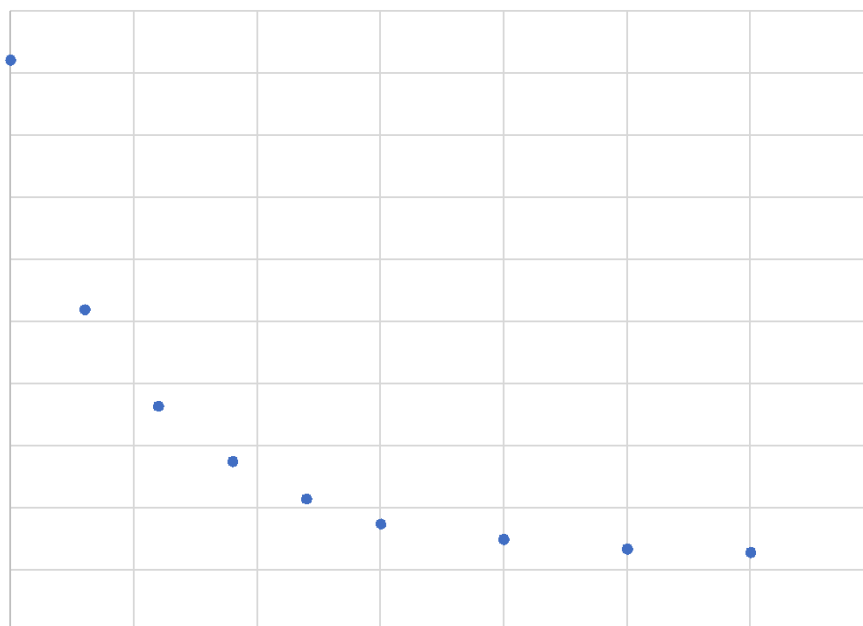
Drugi problem koji je detektiran kod veće koncentracije uzoraka bio je problem aglomeracije, uslijed čega je otopina postala neprozirna te nepogodna za UV-VIS analizu.

Na temelju praćenja intenziteta apsorpcijskog maksimuma iona bakra pri valnoj duljini od 265 nm određena je ovisnost apsorbancije o vremenu kao što je prikazano u tablici 1 i na slici 34.

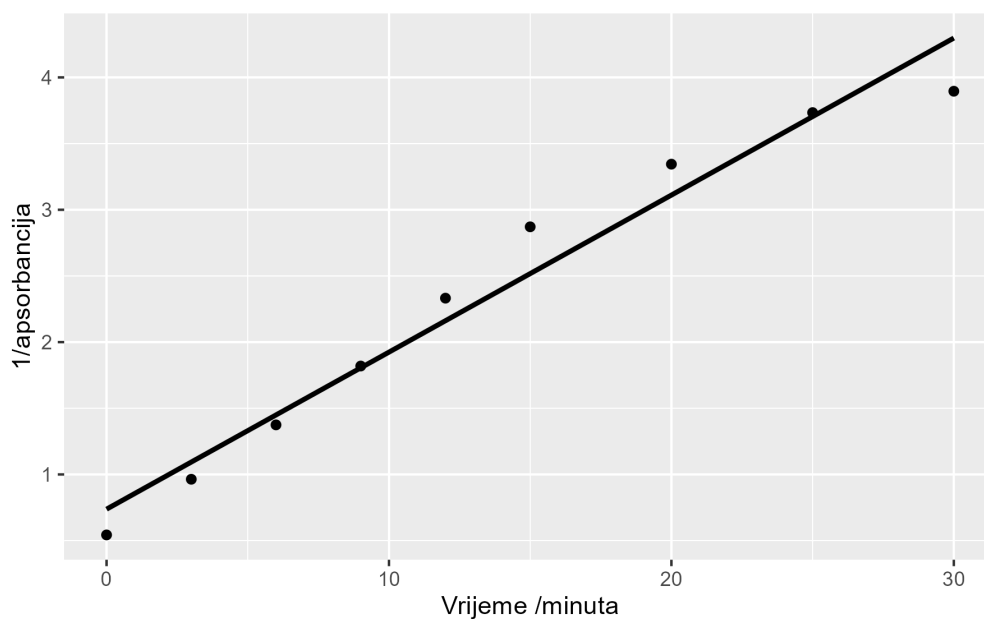
Na temelju tih podataka potvrđeno je da se radi o reakciji drugog reda što je i za očekivati s obzirom na kompleksan mehanizam redukcije bakrovih iona askorbinskom kiselinom.

Tablica 1. Apsorbancije uzoraka nanočestica bakra s askorbinskom kiselinom uz prisutnost PVP stabilizatora praćena UV-VIS spektrometrom kod maksimalne valne duljine od 265 nm

t, min	A
0	1.841
3	1.0376
6	0.7275
9	0.5497
12	0.4288
15	0.3483
20	0.299
25	0.2678
30	0.2567



Slika 36. Korelacija pada apsorbancije uzoraka nanočestica bakra u reakciji s askorbinskom kiselinom uz prisutnost PVP stabilizatora određena UV-VIS spektrometrom kod maksimalne valne duljine od 265 nm



Slika 35. Kinetika reakcije drugog reda prikazana kao ovisnost recipročne vrijednosti apsorbcije ($1/\text{apsorbancija}$) o vremenu (min) s koeficijentom determinacije (R^2) 0.962

8.4. DLS

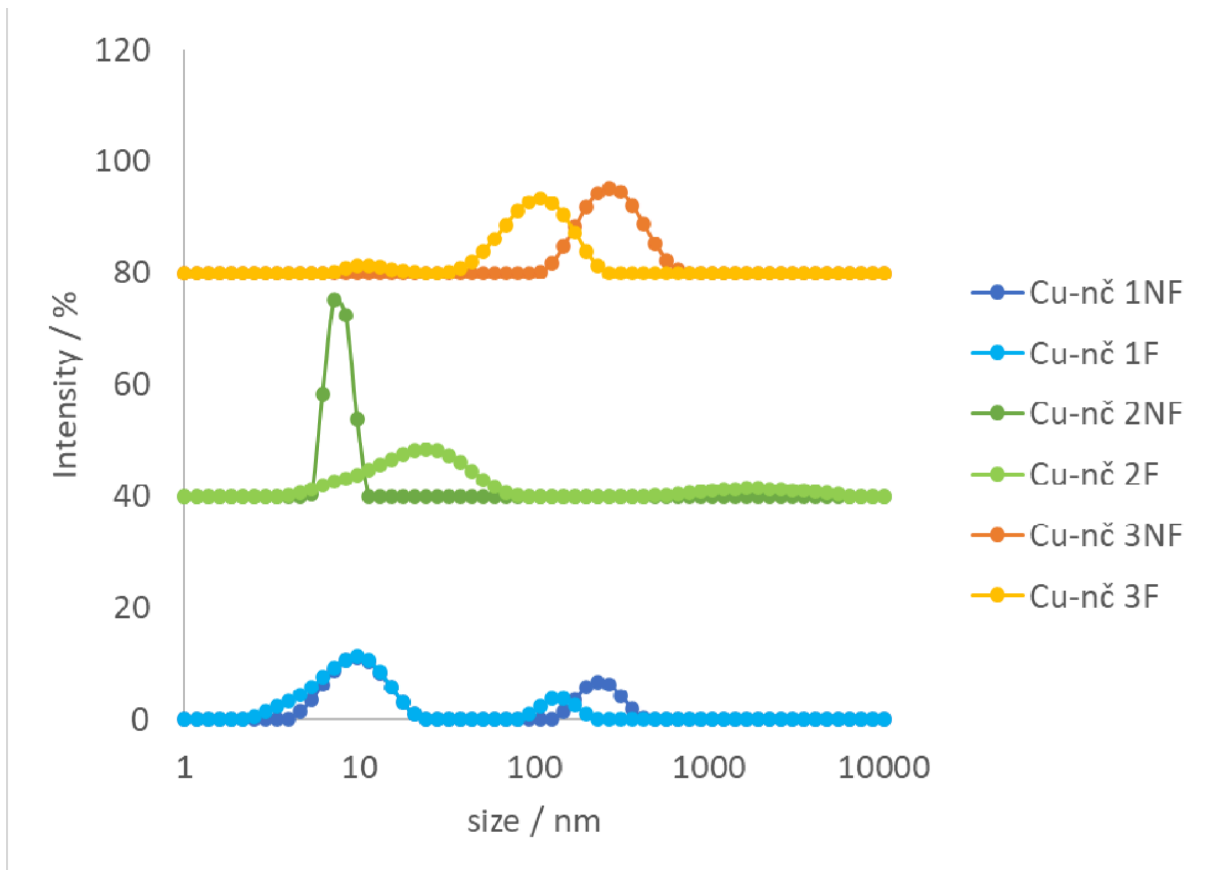
DLS (Dynamic Light Scattering) metoda korištena je za određivanje veličine i distribucije nanočestica u koloidnim sustavima, u našim uzorcima nanočestica bakra dobivenih zelenom metodom pomoću askorbinske kiseline. DLS analiza temeljila se na promjenaka u intenzitetu raspršenog svjetla uzrokovanih Brownovim gibanjima čestica u suspenziji. Kada se laserska zraka usmjeri na suspenziju nanočestica, čestice raspršuju svjetlost pod različitim kutovima. Brzina kojom se mijenja intenzitet raspršenog svjetla ovisi o veličini čestica — manje čestice se gibaju brže, dok se veće gibaju sporije. Kroz analizu ovih fluktuacija u vremenu moguće je izračunati hidrodinamički radijus nanočestica bakra, kao i njihovu distribuciju veličine. DLS metoda je vrlo korisna za karakterizaciju nanočestica u realnim uvjetima, jer omogućuje neinvazivno i brzo mjerenje u disperziranom stanju, bez potrebe za dodatnom pripremom uzorka.

Tablica 2. Rezultati DLS dobiveni na ispitivanim uzorcima nanočestica bakra koje su sintetizirane pomoću askorbinske kiseline

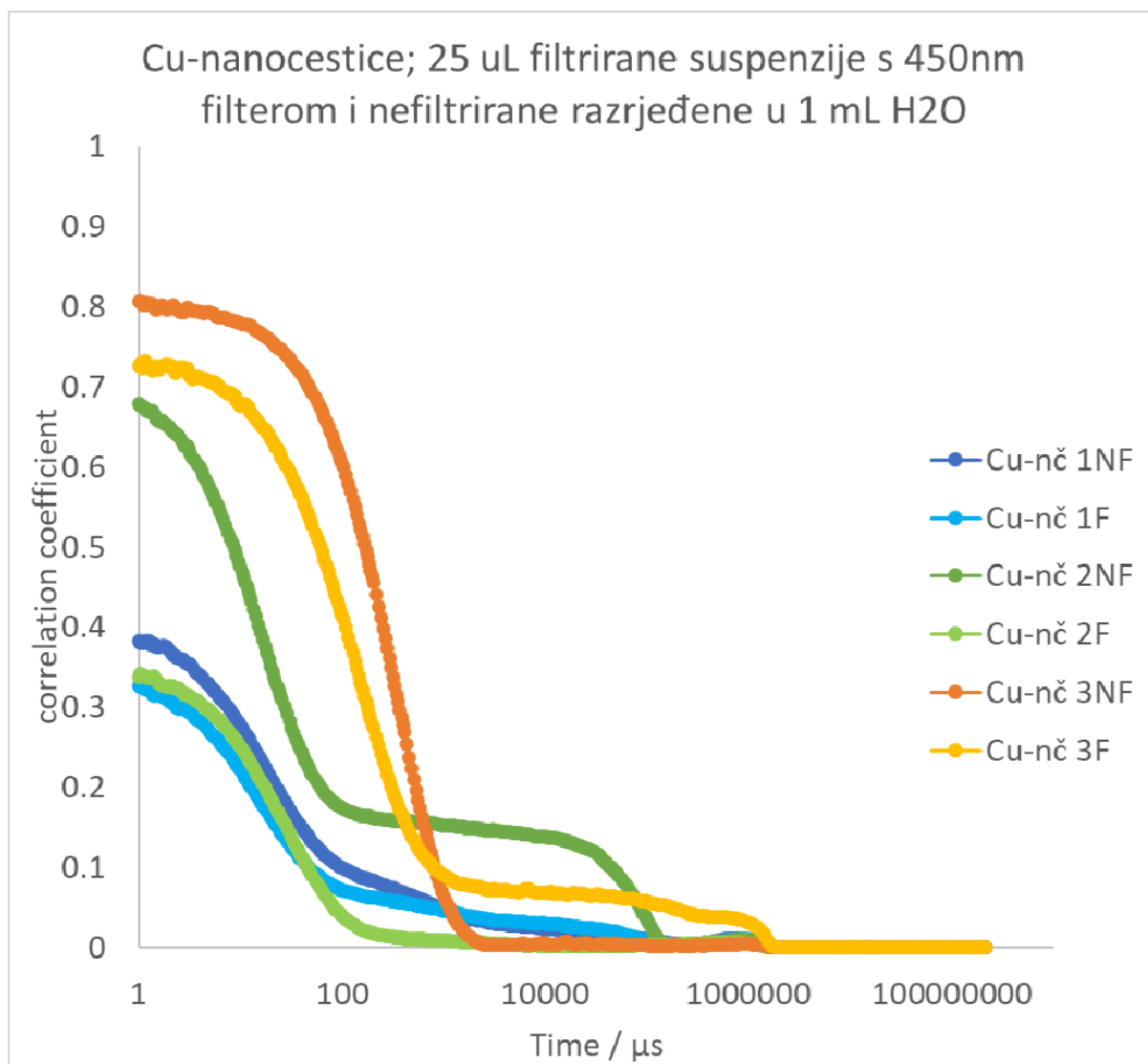
Veličina (d.nm)	Intenzitet (Cu-nanočestice; 25 uL ne/filtrirane suspenzije na 1 mL H ₂ O) / %					
	Cu-nč 1NF	Cu-nč 1F	Cu-nč 2NF	Cu-nč 2F	Cu-nč 3NF	Cu-nč 3F
0.3	0	0	0	0	0	0
0.3489	0	0	0	0	0	0
0.4057	0	0	0	0	0	0
0.4718	0	0	0	0	0	0
0.5487	0	0	0	0	0	0
0.6381	0	0	0	0	0	0
0.742	0	0	0	0	0	0
0.8629	0	0	0	0	0	0
1.003	0	0	0	0	0	0
1.167	0	0	0	0	0	0
1.357	0	0	0	0	0	0
1.578	0	0	0	0	0	0
1.835	0	0	0	0	0	0
2.134	0	0.01524	0	0	0	0
2.482	0	0.5566	0	0	0	0
2.886	0	1.413	0	0	0	0
3.357	0	2.34	0	0	0	0
3.903	0.1799	3.302	0	0.1354	0	0
4.539	1.361	4.43	0	0.6585	0	0
5.279	3.53	5.857	0.3319	1.373	0	0
6.139	6.2	7.565	18.44	2.064	0	0
7.139	8.711	9.309	35.07	2.655	0	0.2048
8.302	10.45	10.66	32.43	3.202	0	0.7616
9.655	11	11.16	13.72	3.819	0	1.255
11.23	10.23	10.48	0	4.591	0	1.394
13.06	8.308	8.597	0	5.525	0	1.166
15.18	5.689	5.891	0	6.533	0	0.7473
17.66	3.019	3.064	0	7.457	0	0.3456
20.53	0.9711	0.9246	0	8.113	0	0.09044
23.88	0	0	0	8.341	0	0
27.77	0	0	0	8.047	0	0
32.3	0	0	0	7.231	0	0.2104
37.56	0	0	0	5.989	0	0.8377
43.68	0	0	0	4.496	0	2.028
50.79	0	0	0	2.973	0	3.829
59.07	0	0	0	1.641	0	6.139
68.69	0	0	0	0.6744	0	8.69
79.88	0	0	0	0.1477	0	11.06

92.89	0	0.8985	0	0	0	12.77
108	0	2.442	0	0	0.2825	13.35
125.6	0.1298	3.682	0	0	1.849	12.52
146.1	1.442	3.788	0	0	4.733	10.33
169.9	3.618	2.637	0	0	8.341	7.189
197.6	5.695	0.9834	0	0	11.81	3.848
229.8	6.705	0	0	0	14.3	1.225
267.2	6.161	0	0	0	15.24	0
310.7	4.291	0	0	0	14.43	0
361.3	1.973	0	0	0	12.09	0
420.2	0.3346	0	0	0	8.775	0
488.7	0	0	0	0.03563	5.263	0
568.3	0	0	0	0.1359	2.337	0
660.9	0	0	0	0.3004	0.5558	0
768.5	0	0	0	0.5118	0	0
893.8	0	0	0	0.744	0	0
1039	0	0	0	0.9698	0	0
1209	0	0	0	1.165	0	0
1406	0	0	0	1.309	0	0
1635	0	0	0	1.392	0	0
1901	0	0	0	1.409	0	0
2211	0	0	0	1.361	0	0
2571	0	0	0	1.258	0	0
2990	0	0	0	1.11	0	0
3477	0	0	0	0.9342	0	0
4043	0	0	0	0.7459	0	0
4702	0	0	0	0.5611	0	0
5468	0	0	0	0.3934	0	0
6358	0	0	0	0	0	0
7394	0	0	0	0	0	0
8599	0	0	0	0	0	0
1.00E+04	0	0	0	0	0	0

Rezultati koji su dobiveni DLS analizom prikazani su na slikama 34 i 35. Valja napomenuti kako su dobiveni rezultati tek preliminarni rezultati koji nemaju visoku pouzdanost mjerenja jer su uzorci sedimentirali i aglomerirali.



Slika 37. DLS rezultati analize veličine nanočestica bakra, 25 μL filtrirana suspenzija s filterom od 450 nm, te nefiltrirane razrijeđene u 1mL H_2O



Slika 38. DLS rezultati analize korelacije nanočestica bakra, 25 μL filtrirana suspenzija s filterom od 450 nm, te nefiltrirane razrijeđene u 1 mL H₂O

8.5. SEM-EDX

SEM mikroskopske tehnike omogućavaju dobivanje informacija o morfologiji, topologiji i karakterizaciji uzorka. SEM-EDX metoda je u ovom istraživanju primijenjena kao brza i jednostavna metoda za određivanje morfologije uzoraka i površinskog kemijskog sastava te raspodjele nanočestica po površini celuloznih materijala. Ova metodologija nudi

veliku prednost u odnosu na druge analitičke instrumentalne metode. Ipak, za potpuni kemijski uvid u kemijski sastav uzorka potrebno je primijeniti i druge spektroskopske tehnike poput ICP-OES ili AAS metoda.

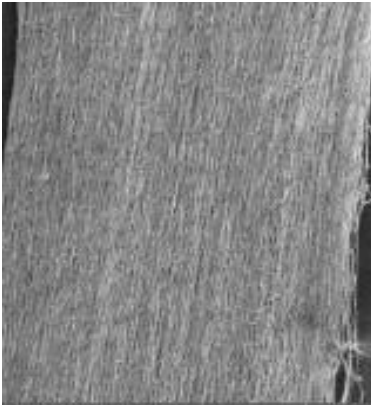
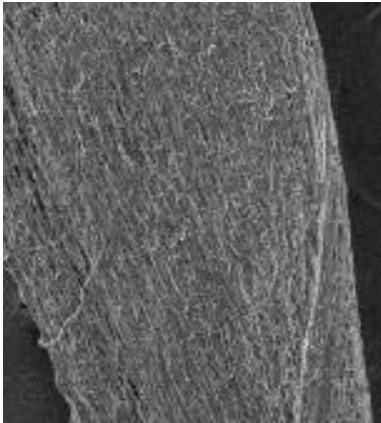
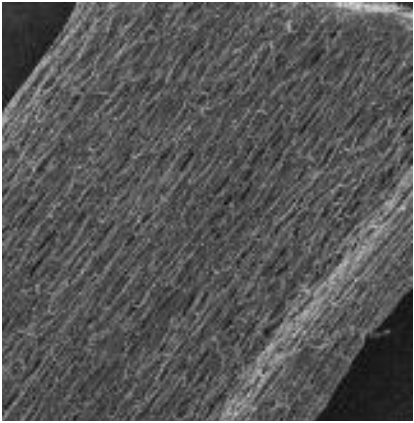

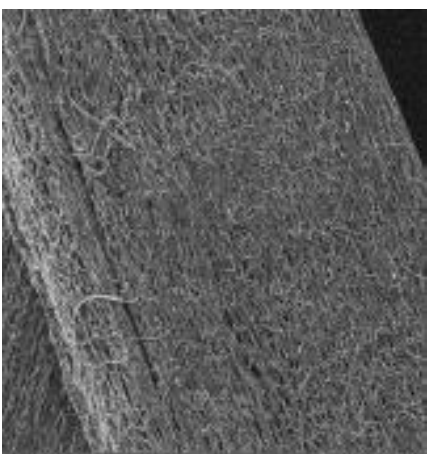
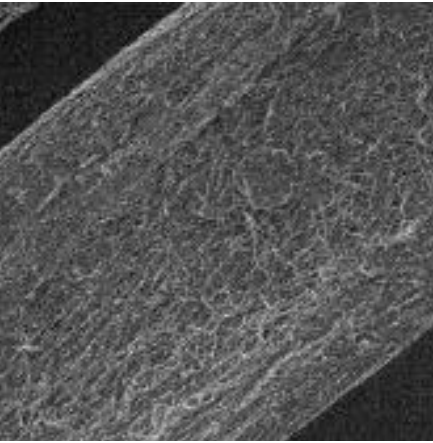
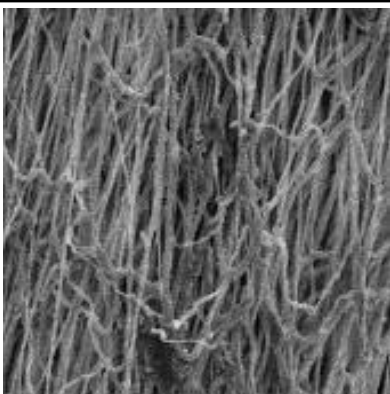
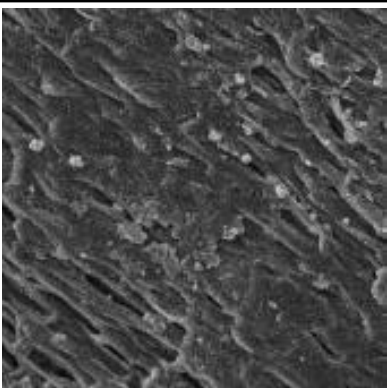
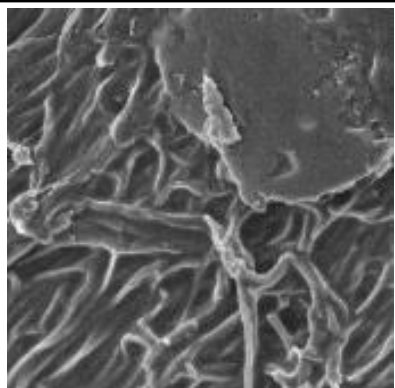
Struktura i morfologija uzoraka prije i nakon modifikacije s nanočesticama zabilježene su na SEM-EDX instrumentu nakon prevlačenja uzoraka s Au/Pd uniformnim premazom kako bi se dobile odgovarajuće mikrofotografije. Uvećanje je bilo $80\times$, $500\times$, $2000\times$ i $5000\times$.

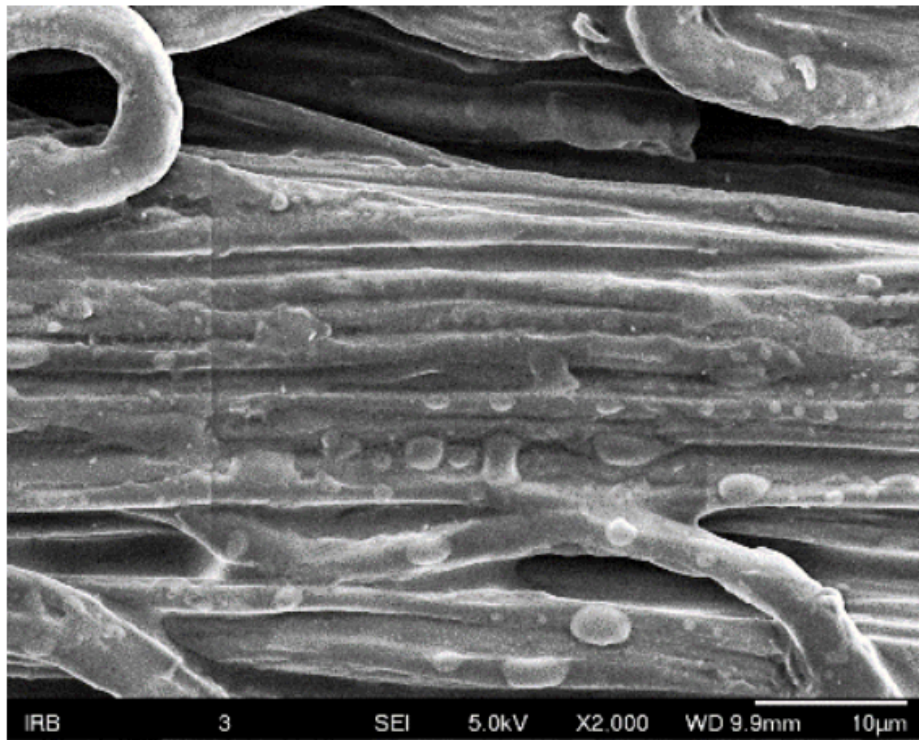
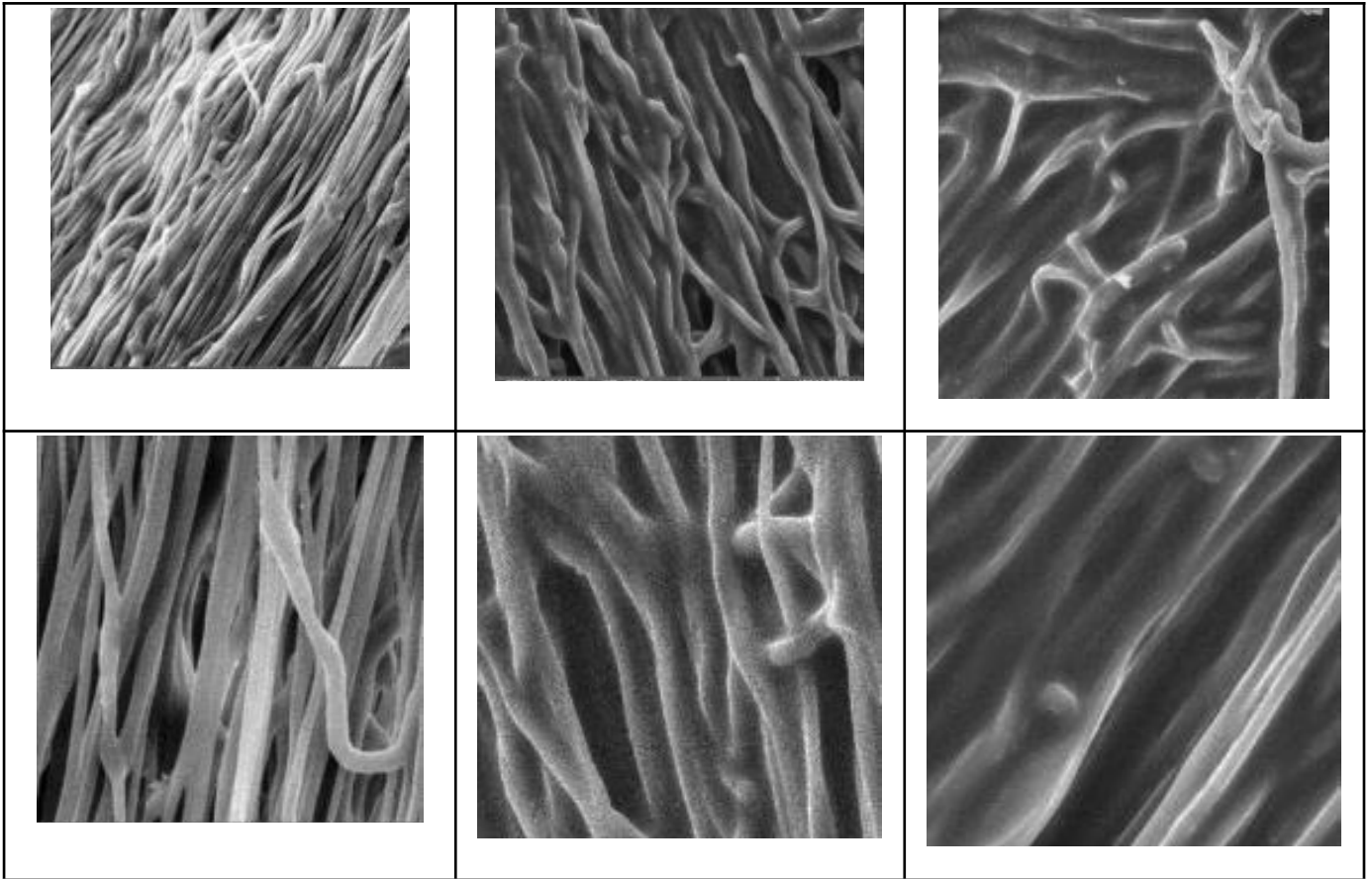
Slika 36 prikazuje SEM mikrofotografiju površina uzoraka celuloze nakon modifikacije s nanočesticama pomoću GLYMO prekursora uz sol-gel postupak.

Tablica 2 prikazuje rezultate SEM analize pojedinih nanočestica u premazima.

Kao što se može vidjeti iz rezultata, SEM mikrofotografije površine kompozitnog elektropredenog uzorka pređe otkrivaju da je na podlozi koja sadrži nanočestice dobiven gladak, tanak film. Osim toga, premaz je ravnomjerno i homogeno raspoređen po cijeloj površini. Stoga se može zaključiti da prednosti sol-gel metode, primijenjene kao tehnologija dubokog premaza, omogućuju homogenost, jednostavnu kontrolu sastava i nisku temperaturu obrade, čime se postiže ravnomjerna raspodjela filmova na podlozi.

Tablica 3. Rezultati SEM analize uzoraka prije i nakon modifikacije

Netratirani uzorci	Uz HCl kao katalizator	Bez katalizatora
		
		
		



Slika 39. SEM slike nakon sol-gel modifikacija.

8.6. Antimikrobna ispitivanja

Tablice 3-7: rezultati antimikrobnih ispitivanja uzoraka s nanočesticama bakra na razne sojeve mikroorganizama (*E. Coli*, *E. faecalis*, *K. Pneumoniae*, *P. Aeruginosa* i *S. aureus*).

Tablica 4. Rezultati antimikrobnih ispitivanja uzoraka nanočestica bakra raznih koncentracija na modelni mikroorganizam *E. Coli*

	Spoj E1 - % inhibicija <i>E.coli</i>	Spoj E2 - % inhibicija <i>E.coli</i>	Spoj E3 - % inhibicija <i>E.coli</i>	Spoj E4 - % inhibicija <i>E.coli</i>	Spoj E5 - % inhibicija <i>E.coli</i>	Spoj E6 - % inhibicija <i>E.coli</i>
µg/ml	91.21	84.24	2.80	0.00	8.77	21.62
256	83.63	79.57	0.00	0.00	3.76	19.91
128	75.76	79.62	0.00	0.00	3.99	9.59
64	71.77	75.85	0.00	0.00	1.13	1.11
32	63.51	71.40	0.00	0.00	0.00	0.00
16	34.85	68.35	0.00	0.00	0.00	0.00
8	15.61	63.07	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	47.71	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	40.70	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	39.33	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	25.19	0.00	0.00	0.00	0.00

Tablica 5. Rezultati antimikrobnih ispitivanja uzoraka nanočestica bakra raznih koncentracija na modelni mikroorganizam *E. Faecalis*

µg/ml	Spoj E1 - % inhibicija <i>E.faecalis</i>	Spoj E2 - % inhibicija <i>E.faecalis</i>	Spoj E3 - % inhibicija <i>E.faecalis</i>	Spoj E4 - % inhibicija <i>E.faecalis</i>	Spoj E5 - % inhibicija <i>E.faecalis</i>	Spoj E6 - % inhibicija <i>E.faecalis</i>
256	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
128	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
64	86.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
32	69.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16	58.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	46.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	25.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	9.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tablica 6. Rezultati antimikrobnih ispitivanja uzoraka nanočestica bakra raznih koncentracija na modelni mikroorganizam *K. Pneumoniae*

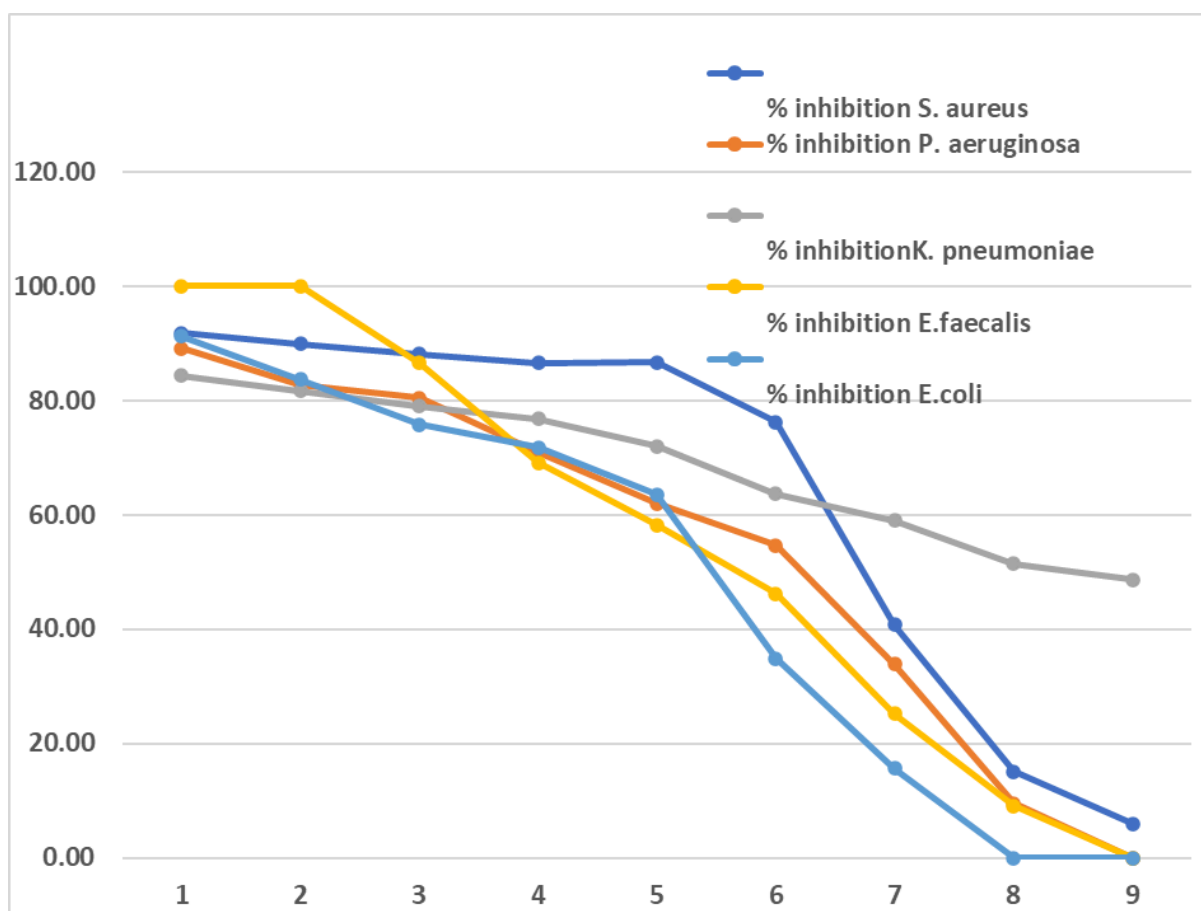
µg/ml	Spoj E1 - % inhibicija <i>K. pneumoniae</i>	Spoj E2 - % inhibicija <i>K. pneumoniae</i>	Spoj E3 - % inhibicija <i>K.pneumoniae</i>	Spoj E4 - % inhibicija <i>K. pneumoniae</i>	Spoj E5 - % inhibicija <i>K.pneumoniae</i>	Spoj E6 - % inhibicija <i>K. pneumoniae</i>
256	84.30	0.00	22.17	0.00	23.26	49.54
128	81.69	0.00	12.70	0.00	5.90	29.98
64	79.03	0.00	0.22	0.00	4.17	15.23
32	76.84	0.00	0.00	0.00	4.78	3.43
16	72.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	63.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	58.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	51.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	48.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	39.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	34.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tablica 7. Rezultati antimikrobnih ispitivanja uzoraka nanočestica bakra raznih koncentracija na modelni mikroorganizam *P. Aeruginosa*

µg/ml	Spoj E1 - % inhibicija <i>P. aeruginosa</i>	Spoj E2 - % inhibicija <i>P. aeruginosa</i>	Spoj E3 - % inhibicija <i>P. aeruginosa</i>	Spoj E4 - % inhibicija <i>P. aeruginosa</i>	Spoj E5 - % inhibicija <i>P. aeruginosa</i>	Spoj E6 - % inhibicija <i>P. aeruginosa</i>
256	89.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
128	82.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
64	80.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
32	70.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16	61.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	54.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	33.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	9.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tablica 8. Rezultati antimikrobnih ispitivanja uzoraka nanočestica bakra raznih koncentracija na modelni mikroorganizam *S. aureus*

µg/ml	Spoj E1 - % inhibicija <i>S. aureus</i>	Spoj E2 - % inhibicija <i>S. aureus</i>	Spoj E3 - % inhibicija <i>S. aureus</i>	Spoj E4 - % inhibicija <i>S. aureus</i>	Spoj E5 - % inhibicija <i>S. aureus</i>	Spoj E6 - % inhibicija <i>S. aureus</i>
256	91.77	0.00	0.00	0.00	41.73	32.32
128	89.87	0.00	0.00	0.00	18.74	22.48
64	88.14	0.00	0.00	0.00	12.01	17.91
32	86.51	0.00	0.00	0.00	0.00	13.53
16	86.70	0.00	0.00	0.00	0.00	8.15
8	76.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	40.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	15.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	6.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



Slika 40. Sumarna usporedba djelovanja nanočestica bakra na razne mikroorganizme pokazuje najveću učinkovitost na sojeve *Staphylococcus aureus*, koje u potpunosti suzbija nakon 8 sati djelovanja

9. ZAKLJUČAK

Nanočestice bakra imaju jaka antimikrobna svojstva zbog svoje velike površine te sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje oštećuju stanice mikroorganizama zbog čega imaju velik potencijal kao antimikrobna sredstva te mogu imati široku primjenu. U ovom radu nanočestice bakra dobivene su korištenjem askorbinske kiseline kao redukcijskog sredstva. Korištenje askorbinske kiseline kao redukcijskog sredstva ima prednost zbog toga što je jeftina, ekološki prihvatljiva i netoksična u usporedbi s nekim drugim redukcijskim agensima. Također, kao otapalo korištena je voda što sam proces čini ekološki prihvatljivijim. Reakcija bakra i askorbinske kiseline, te nastajanje nanočestica praćeno je UV/VIS spektroskopijom koja omogućuje kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Vrhovi koji se pojavljuju daju informacije o prisutnim reagensima, a njihovi intenziteti daju informaciju o koncentraciji nanočestica. Karakteristični vrhovi javljaju se pri valnim duljinama 260-270 nm i 340-360 nm. Za određivanje srednje veličine čestica te njihove distribucije korištena je metoda DLS-a. Najveći intenziteti Cu-čestica javljaju se pri veličinama 10-100 nm, no rezultati ovih mjerenja nemaju visoku pouzdanost zbog sedimentacija i aglomeracije uzoraka.

Dobivene nanočestice bakra učvršćene su u antimikrobne prevlake sol-gel metodom korištenjem prekursora GLYMO reagensa za funkcionalizaciju čestica. Modifikacijom površinskih svojstava sol-gel metodom poboljšavaju se svojstva materijala te time i njihova antimikrobna aktivnost. Za karakterizaciju čestica korištene su tehnike Ramanove spektroskopije, FTIR-a i NMR-a kojima je potvrđena uspješna modifikacija površine. Dobiveni uzorci prije i nakon modifikacije promatrani su pod skenirajućim elektronskim mikroskopom kako bi se promatrala svojstva površine te je vidljivo kako uzorci nanoseni sol-gel metodom ravnomjerno su raspoređeni po cijeloj površini.

Antimikrobna ispitivanja provedena su nanošenjem nanočestica bakra na elektroispredena vlakna i pređu. Provedeni su difuzijski test na agaru i test serijske mikrodilucije u bujonu te je određena minimalna inhibicijska koncentracija (MIC). Ispitivanja su provedena na 5 različitih sojeva mikroorganizama te su nanočestice bakra u svim ispitivanjima pokazala antimikrobnu aktivnost što pokazuje njihov izuzetan potencijal.

Vodoodbojne prevlake mogu pružiti barijeru protiv mikrobne kontaminacije sprječavajući pričvršćivanje i rast mikroorganizama na površinama, no njihova učinkovitost

može biti ograničena. Nanočestice bakra mogu se ugraditi u vodoodbojne prevlake te se na taj način mogu poboljšati njihova antimikrobna svojstva. Dodatak nanočestica bakra vodoodbojnim prevlakama značajno poboljšava njihovu sposobnost ubijanja ili inhibicije rasta širokog spektra mikroorganizama te njihovo međudjelovanje povećava ukupnu antimikrobnu aktivnost. Dodatno, učinkovitost prevlaka od nanočestica bakra može se povećati kombinacijom s drugim nanočesticama kao što su srebro, cinkov oksid ili titanijev dioksid.

Različite nanočestice mogu imati komplementarne mehanizme djelovanja, što dovodi do jačeg antimikrobnog djelovanja. Neka od poboljšanih svojstava su povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, poboljšana disperznost i stabilnost te širok spektar antimikrobnog djelovanja. No, kako bi se postigli željeni antimikrobni učinci potrebna je optimizacija sastava, veličine i omjera nanočestica. Ovakvi kombinirani sustavi mogu imati potencijalno toksični učinak na ljude i okoliš. Čimbenici kao što su sredstva za stabilizaciju, metode sinteze i uvjeti obrade također mogu utjecati na proces optimizacije. Kako bi se utvrdila učinkovitost ovakvih sustava potrebno je provesti standardne antimikrobni testovi, kao što su testovi zone inhibicije te određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC). Testove je potrebno provesti u određenim uvjetima (npr. različiti mediji, pH, temperatura) kako bi se oponašale primjene u stvarnom svijetu. Poboljšana antimikrobna svojstva nanočestica bakra u kombinaciji s drugim nanočesticama imaju potencijalnu primjenu u područjima kao što su medicina, tekstil, ambalaža za hranu i drugi.

Kombinacija nanočestica bakra s drugim vrstama nanočestica može biti učinkovita metoda za pojačavanje njihove antimikrobne aktivnosti, što doprinosi novim učinkovitim antimikrobnim rješenjima, ali je potrebno provesti daljnje korake karakterizacije i optimizacije kako bi svojstva dobivenih antimikrobnih prevlaka bila validirana za specifične primjene na medicinskim materijalima.

10. LITERATURA

- [1] Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F., The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine, *Molecules*, **25** (2020), 112
- [2] Mekuye, B., Abera, B., Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications, *Nano select*, **4** (2023), 486-501
- [3] Khan, I., Saeed, K., Khan, I., Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arab. J. Chem.*, **12** (2019), 908-931
- [4] <https://www.elprocus.com/nanomaterials-classifications-and-its-properties/#:~:text=Here%20the%20nanoparticles%20are%20further,their%20dimensions%20falls%20under%20nanoscale> (pristup 15.8.2024.)
- [5] Asha, A.,B., Narain, R., Nanomaterials properties, *Polym. Sci. Tech.*, **15** (2020), 343-359
- [6] Hulla, J., Sahu, S., Hayes, A., Nanotechnology: History and future, *HET*, **12** (2015), 1318-1321
- [7] Feynman, R.P., There's plenty of room at the bottom, *Eng. Sci.* **23** (1960), 22–36.
- [8] <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=6737> (pristup 22.8.2024.)
- [9] Escorcia-Díaz, D., García-Mora, S., Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M., Ocampo-López, C.. Advancements in Nanoparticle Deposition Techniques for Diverse Substrates: A Review, *Nanomaterials*, **13** (2023), 2586
- [10] Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S. *et al.*, Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?, *Environ Sci Eur*, **30** (2018)
- [11] Mott, S.H., The Size of Matter: Why Properties Change at the Nanoscale, Yale National Initiative, 2010
- [12] https://www.researchgate.net/figure/Nanomaterials-have-a-characteristic-dimension-in-the-size-range-from-1-to-100-nm-The_fig1_263723744 (pristup 22.8.2024.)
- [13] <https://www.nano.gov/about-nanotechnology/what-is-so-special-about-nano#:~:text=At%20the%20nanoscale%2C%20properties%20such,that%20occur%20at%20the%20nanoscale> (pristup 22.8.2024.)

- [14] Kumar K, H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., Kuila, A., Metallic Nanoparticle: A Review, *Biomed. J. Sci. & Tech. Res.*, **2** (2018), 3765-3775
- [15] Paliy, A., Kovalenko, L., Romanko, M., Stegnyy, M., Yu., Kolchyk, O., V., Zavgorodniy, A., I., 1 , Biological properties of nanomaterials (literature review), *JVMBBS*, **9** (2023), 20-30
- [16] Kumah, E.A., Fopa, R.D., Harati, S. *et al.* Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature. *BMC Public Health*, **23** (2023), 1059
- [17] Tamilvanan, A., Kulendran, B., Balamurugan, K., Ponappa, K., Kumar, B, Copper Nanoparticles: Synthetic Strategies, Properties and Multifunctional Application, *Int. J. Nanosci.*, **13** (2014)
- [18] Rodriguez-Loya, J., Lerma, M., Gardea-Torresdey, J.L., Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review. *Micromachines*, **15** (2024), 24
- [19] <https://wiki.anton-paar.com/tw-zh/the-principles-of-dynamic-light-scattering/> (pristup 27.8.2024.)
- [20] Malatesta, M., Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures, *Int J Mol Sci.*, **22** (2021), 12789
- [21] https://www.afmworkshop.com/newsletter/comparing-afm-sem-and-tem?srsId=AfmBOooya sK2omYr-hd7-D-JECt1FeUNJgHwEmCi_9GjorxZrJL515k4 (pristup 10.9.2024.)
- [22] Crisan, M.C., Mocan, T., Mocan, C., Copper Nanoparticles: Synthesis and Characterization, Physiology, Toxicity and Antimicrobial Applications, *Nanotechnol. Biomed. Appl.*, **12** (2022), 141
- [23] Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., Roopan, S. M., Nanoparticle characterization techniques, *Charact. Appl. Nanomater.*, **12** (2019), 303–319.
- [24] <https://nanoeath.ictas.vt.edu/access/selector/uv-vis.html> (pristup 12.9.2024.)
- [25] Cassano, R., Curcio, F., Di Gioia, M.L., Trombino, S., Copper nanoparticles-based stimuli-responsive approaches, *Stimuli-Responsive Nanocarriers Vol. 14, AP*, Cosenza, 2022, str. 413-428
- [26] Gawande, M.B., Goswami, A., Felpin, F.X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R., Zou, X., Zboril, R., Varma, R.S., Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis, *Chem. Rev.*, **116** (2016), 3722-3811

- [27] Shi, M., Soo Kwon, H., Peng, Z., Elder, A., Yang, H., Effects of Surface Chemistry on the Generation of Reactive Oxygen Species by Copper Nanoparticles, *ACS Nano*, **6** (2012), 2157-2164
- [28] Imran Din, M., Rehan, R., Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles, *Anal. Lett.*, **50** (2017), 50-62
- [29] https://www.researchgate.net/publication/51083007_Copper_nanoparticles_synthesized_by_polyol_process_used_to_control_hematophagous_parasites
- [30] Ivanova, I.A., Daskalova, D.S., Yordanova, L.P., Pavlova, E.L., Copper and Copper Nanoparticles Applications and Their Role against Infections: A Minireview. *Processes*, **12** (2024), 352
- [31] More, P.R., Pandit, S., Filippis, A., Franci, G., Mijakovic, I., Galdiero, M., Silver Nanoparticles: Bactericidal and Mechanistic Approach against Drug Resistant Pathogens, *Microorganisms*, **11** (2023), 369
- [32] Li, J., Xie, S., Ahmed, S., et al., Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Front Pharmacol.*, **8** (2017), 364
- [33] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00254> (pristup 10.9.2024.)
- [34] <https://ideal-turf.com/artificial-grass/antimicrobial/> (pristup 16.9.2024.)
- [35] Usman, M. S., Zowalaty, M. E. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., Ibrahim, N. A. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, **8** (2013), 4467–4479
- [36] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9459344/> !!!!!
- [37] <https://www.consilium.europa.eu/en/infographics/antimicrobial-resistance/> (pristup 10.9.2024.)
- [38] Shani, L., Nissan, I., Editorial: Antibiotics overuse as the driving force behind antimicrobial resistance, *Front Cell Infect Microbiol.*, **14** (2024)
- [39] <https://www.statista.com/chart/3095/drug-resistant-infections/> (pristup 16.9.2024.)
- [40] Sirwan, K.A., Safin, H., Karzan, Q., Radhwan, H. I., Abdulmalik, F., Kochr, A., M., Mona, G. M., Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects, *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, **2** (2024)

- [41] Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., Okoh, A., Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications, *Molecules*, **23** (2018), 795
- [42] Longano, D., Ditaranto, N., Sabbatini, L., Torsi, L., Cioffi, N., Synthesis and Antimicrobial Activity of Copper Nanomaterials, *Nano-Antimicrobials*, **3** (2011), 85-117
- [43] Jiang, H., Li, L., Li, Z. *et al.* Metal-based nanoparticles in antibacterial application in biomedical field: Current development and potential mechanisms, *Biomed Microdevices*, **26** (2024)
- [44] Girma, A., Alternative mechanisms of action of metallic nanoparticles to mitigate the global spread of antibiotic-resistant bacteria, *The Cell Surface*, **10** (2023)
- [45] Yılmaz, G.E.; Göktürk, I.; Ovezova, M.; Yılmaz, F.; Kılıç, S.; Denizli, A. Antimicrobial Nanomaterials: A Review, *Hygiene* **3** (2023), 269-290
- [46] Woźniak-Budych, M.J., Staszak, K., Staszak, M., Copper and Copper-Based Nanoparticles in Medicine-Perspectives and Challenges, *Molecules*, **18** (2023), 6687
- [47] Abdal Dayem, A., Hossain, M.K., Lee, S.B., et al., The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles, *Int J Mol Sci*, **18** (2017), 120
- [48] Ray, P.C., Yu, H., Fu, P.P., Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, **27** (2009), 1-35
- [49] Malik, S., Muhammad, K., Waheed, Y., Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine, *Molecules*, **18** (2023), 6624
- [50] Zhao, Q., Cheng, N., Sun, X., Yan, L., Li, W., The application of nanomedicine in clinical settings, *Front Bioeng Biotechnol.*, **11** (2023)
- [51] Cunliffe, A.J., Askew, P.D., Stephan, I., et al., How Do We Determine the Efficacy of an Antibacterial Surface? A Review of Standardised Antibacterial Material Testing Methods, *Antibiotics (Basel)*, **9** (2021), 1069
- [52]
<https://www.graphpad.com/support/faq/fitting-bacterial-growth-data-to-determine-the-mic-and-nic/> (pristup 17.9.2024.)

*** Rezultati ovog diplomskog rada objavljeni su kao postersko izlaganje na znanstvenom skupu Hrvatskog kemijskog društva RijekaPulaChem 2024 u Rijeci 5-6. rujna 2024. godine.*

11. ŽIVOTOPIS

Završila sam Prvu Privatnu gimnaziju u Varaždinu 2017. godine te po završetku upisala smjer Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Preddiplomski studij završila sam 2021. godine s temom Penroseovo popločavanje i struktura kvazikristala te iste godine upisala diplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Znanstveni radovi sa skupova:

Čemerin, Katja ; Majdak, Mislav ; Mouthouy Pierre Alexis; Somogyi Škoc, Maja ; Meštrović, Ernest ; Rezić, Iva ; Application of Cu nanoparticles in antimicrobial coatings // BOOK OF ABSTRACTS, SUMMER CONFERENCE OF CROATIAN CHEMICAL SOCIETY RIJEKA – PULA 2024 / Rezić, Iva (ur.). Zagreb: *CROATIAN CHEMICAL SOCIETY*, 2024. str. 70-70