International Interdisciplinary Journal of Young Scientists from the Faculty of Textile Technology

Optimizacija hidrofobnosti površine antiviralnih i antimikrobnih materijala

Petra Glagolić

SAŽETAK:
Antimikrobna i antiviralna svojstva materijala ključna su za sprječavanje razvoja infekcija i širenja patogenih mikroorganizama, posebice u medicinskim i industrijskim primjenama. Ovaj rad istražuje optimizaciju hidrofobnosti površina obloženih nanočesticama bakra kako bi se poboljšala njihova učinkovitost u inhibiciji rasta mikroorganizama i formiranju biofilma. Cilj ovog završnog rada je sinteza nanočestica bakra korištenjem ekološki prihvatljivih i neagresivnih reagensa te ispitati njihov utjecaj na površinska svojstva. Razvoj takvih metoda od posebne je važnosti u području antimikrobne zaštite, s obzirom na to da su nanočestice bakra poznate po svojoj visokoj učinkovitosti u borbi protiv mikroorganizama.U eksperimentalnom dijelu rada korištene su različite metode sinteze nanočestica, pri čemu su analizirani parametri poput veličine čestica, stabilnosti otopine te ponašanje otopina prilikom depozicije na podlogu. Nanočestice su karakterizirane UV/Vis spektroskopijom, a provedena je i mikroskopska analiza nastalih *coffee ring* efekta za određivanje prisutnosti i ponašanja nanočestica bakra. Karakterizacija materijala obuhvatila je mjerenja kontaktnog kuta pripremljenih otopina na površini elektrosipredenih nanovlakana polikaprolaktona (PCL-a), radi određivanja s hidrofobnosti površine te je isti uspoređen s konačnim materijalom dobivenim elektroispredanjem nanovlakana PCL-a s nanočesticama bakra. Jedan od ključnih aspekata ove problematike jest interakcija nanočestica s površinama stanica, pri čemu je važno razumjeti povezanost fizikalno-kemijskih svojstava površine s antimikrobnim djelovanjem. Rezultati istraživanja pokazali su da optimizacija ovih svojstava može poboljšati antimikrobnu učinkovitost materijala. Površine s izraženijom hidrofobnošću smanjuju mogućnost adhezije bakterija i virusa, čime se potencijalno produžuje vijek trajanja zaštitnih slojeva i poboljšava njihova funkcionalnost u realnim uvjetima primjene. Ovakav pristup predstavlja važan korak u razvoju naprednih antimikrobnih materijala temeljenih na principima zelene kemije i održivih tehnologija. Glavne prednosti ovakvog pristupa su izrazito mala toksičnost, jednostavnost te brzina sintetiziranja samih nanočestica.
Ključne riječi: nanočestice, zelena kemija, bakar, hidrofobnost, mikroorganizmi, optimizacija

ABSTRACT:
The antimicrobial and antiviral properties of materials are essential for preventing the onset of infections and the proliferation of pathogenic microorganisms, particularly in medical and industrial contexts. This thesis investigates the optimization of surface hydrophobicity of copper nanoparticle-coated substrates in order to enhance their efficacy in inhibiting microbial growth and biofilm formation. The primary objective is to synthesize copper nanoparticles employing environmentally benign and non-aggressive reagents, and to evaluate their influence on surface characteristics. The development of such approaches is of particular significance in the field of antimicrobial protection, given the well-documented antimicrobial potency of copper nanoparticles. In the experimental section, various nanoparticle synthesis methods were employed, with systematic analysis of parameters such as particle size, colloidal stability, and deposition behavior on solid substrates. The presence and distribution of copper nanoparticles were characterized via UV/Vis spectroscopy, while microscopic evaluation of the coffee-ring effect was conducted to elucidate nanoparticle behavior and morphology. Material characterization included contact angle measurements of the synthesized dispersions deposited on electrospun PCL (polycaprolactone) nanofibers, to assess surface hydrophobicity. These measurements were compared with those obtained from final composite materials produced by electrospinning PCL in the presence of copper nanoparticles. A key aspect of this research lies in elucidating the interactions between nanoparticles and biological surfaces, wherein the correlation between physicochemical surface properties and antimicrobial performance is critical. The findings indicate that tailoring these surface characteristics can significantly enhance the antimicrobial activity of the material. Surfaces exhibiting increased hydrophobicity demonstrate reduced microbial adhesion, thereby potentially extending the durability and functional performance of protective coatings under real-world application conditions. This strategy represents a meaningful advancement in the development of next-generation antimicrobial materials, grounded in the principles of green chemistry and sustainable technological practices. The main advantages of this approach include low toxicity, simplicity, and rapid synthesis of nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, green chemistry, copper, hydrophobicity, microorganisms, optimization

UVOD

Globalni izazovi s antimikrobnom rezistencijom predstavljaju značajan problem, koji zahtijeva razvoj novih i učinkovitih rješenja. Povećana otpornost bakterija na antibiotike i pojava mikroorganizama otpornih na više lijekova smanjuju učinkovitost konvencionalnih tretmana te je zbog toga povećana potreba za inovativnim materijalima s antimikrobnim svojstvima, koji se mogu koristiti u raznim područjima, uključujući medicinu, industriju hrane, javne prostore i kućanstva [1]. Nanočestice metala, posebno bakra, sve su više prepoznate kao održiva i učinkovita alternativa klasičnim antimikrobnim sredstvima. Njihovo djelovanje temelji se na generiranju reaktivnih vrsta kisika (ROS), oslobađanju iona i interakcijama sa staničnim membranama mikroorganizama, što dovodi do inhibicije rasta bakterija i virusa [2, 3, 4].

Tradicionalni postupci sinteze nanočestica često su skupi, energetski zahtjevni i štetni za okoliš. Zeleni postupci sinteze, temeljeni na primjeni biljnih ekstrakata i prirodnih reducensa, doprinose održivosti i ekološkoj prihvatljivosti. Ovakvi pristupi u skladu su s načelima zelene kemije, čineći ih ključnim za daljnji razvoj održivih tehnologija [5, 3].

Osim izravnog antimikrobnog djelovanja, značajan utjecaj na učinkovitost ovih materijala ima hidrofobnost njihove površine. Hidrofobnost površina ima ključnu ulogu u smanjenju adhezije mikroorganizama i sprječavanju formiranja biofilma [6]. Hidrofobne i superhidrofobne površine otežavaju vezanje mikroorganizama, čime se smanjuje potreba za kemijskim dezinfekcijskim sredstvima i produljuje trajnost zaštitnih premaza. U kombinaciji s antimikrobnim svojstvima nanočestica, hidrofobne površine mogu pružiti superiornu zaštitu i učinkovitost u kontroli mikrobiološke kontaminacije [7, 4, 8, 9].

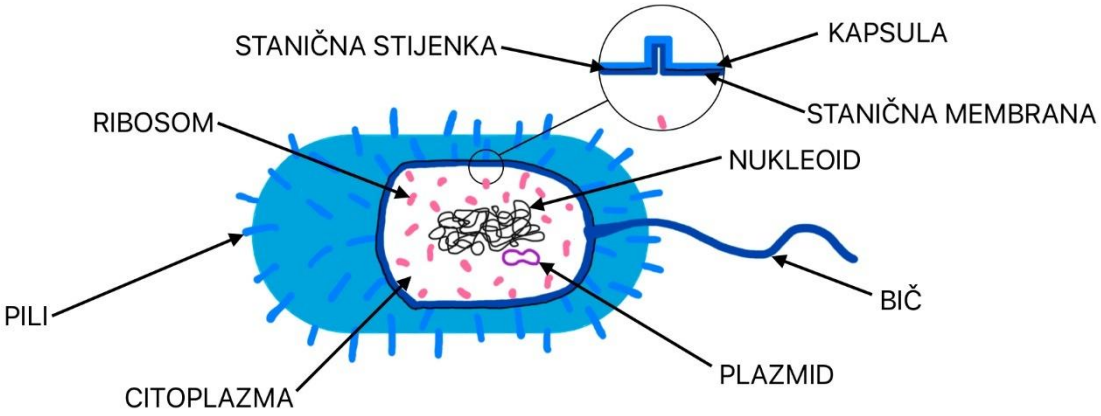
Cilj ovog istraživanja je sintetizirati nanočestice bakra korištenjem zelenih postupaka te ih deponirati na različite podloge. Nadalje, cilj je optimizirati hidrofobnost površina obloženih nanočesticama kako bi se postigla njihova maksimalna antimikrobna i antivirusna učinkovitost. Posebna pažnja posvećuje se uspostavljanju korelacije između metoda pripreme, svojstava nanočestica i konačnih svojstava površina s ciljem razvoja inovativnih i ekološki održivih antimikrobnih rješenja.

1. LITERATURNI PREGLED

2.1. Mikroorganizmi i virusi te njihov utjecaj na razvoj civilizacije

Mikroorganizmi su neizostavni dio života na Zemlji te imaju ključnu ulogu u ekosustavima, biogeokemijskim ciklusima i ljudskom zdravlju. Dijele se u dvije velike skupine: prokariote (bakterije i arheje) i eukariote (gljivice, protozoe i alge). Navedeni organizmi su vidljivi samo mikroskopom, a svojom raznolikošću i prilagodljivošću omogućili su razvoj složenih bioloških sustava. Postoje različite vrste mikroorganizama, koje se odlikuju različitim veličinama i masom, a dijele se na jednostanične i višestanične, pri čemu samo virusi rastu unutar domaćina [1]. Svaka vrsta mikroorganizma ima ključnu ulogu u ekosustavu i može imati i pozitivan i negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš. Mikroorganizmi sudjeluju u različitim biološkim procesima, kao što su razgradnja organske tvari, proizvodnja kisika, izvor hrane za biljke te igraju važnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja. Oni su otporni na ekstremne uvjete poput visokog tlaka, radijacije, pH promjena i temperature. Mikroorganizmi spadaju među najranije oblike života na Zemlji te su tijekom geološkog vremena značajno utjecali na klimu i ekosustav. Puni opseg života mikroba još nije poznat, no uspješno su pronađeni čak i u ekstremno suhoj pustinji Atacama u Čileu, što potvrđuje njihovu izuzetnu otpornost. Osim korisnih svojstava, mikroorganizmi su i uzročnici mnogih zaraznih bolesti, koje su povijesno imale snažan utjecaj na ljudsku populaciju. Pojava antibiotika sredinom 20. stoljeća omogućila je učinkovitu kontrolu bakterijskih infekcija, no njihova prekomjerna uporaba dovela je do razvoja otpornosti mikroorganizama na lijekove, što danas predstavlja jedan od najvećih globalnih zdravstvenih izazova [10].

Bakterije su među najjednostavnijim, ali i najraznolikijim mikroorganizmima. Prisutne su gotovo u svim vrstama staništa, pa tako i u ljudskom organizmu. Postoje korisne, odnosno dobre i patogene, odnosno loše bakterije, koje uzrokuju razne bolesti. Građa bakterije prikazana je slikom 1. Citoplazma je polutekuća tvar unutar bakterijske stanice koja sadrži plazmid, nukleoid (genetski materijal) i ribosome. Stanična ovojnica sastoji se od više slojeva, uključujući staničnu membranu, staničnu stijenku i kapsulu. Bič, koji bakteriji omogućava kretanje, djelomično je pričvršćen na staničnu membranu, a djelomično na staničnu stijenku. Na površini stanice nalaze se pili, strukture zaslužne za pričvršćivanje bakterije na stanice drugih mikroorganizama [11].



Slika 1. Shematski prikaz građe bakterija [11]

Bakterije se prema obliku dijele na štapićaste i zakrivljene oblike [10]. Arheje, odnosno archaebakterije, smatraju se preostalim tragovima ranog života na Zemlji, te su prisutne u ekstremnim uvjetima poput Mrtvog mora, vulkanskim izvorima i ventilima na dnu oceana. Izgledom nalikuju bakterijama, no puno su jednostavnije i koriste energiju iz ugljikovog dioksida, vodika i sumpora. Detaljan prikaz sličnosti i razlika između bakterija i arheja prikazan je u Tablici 1. [12]

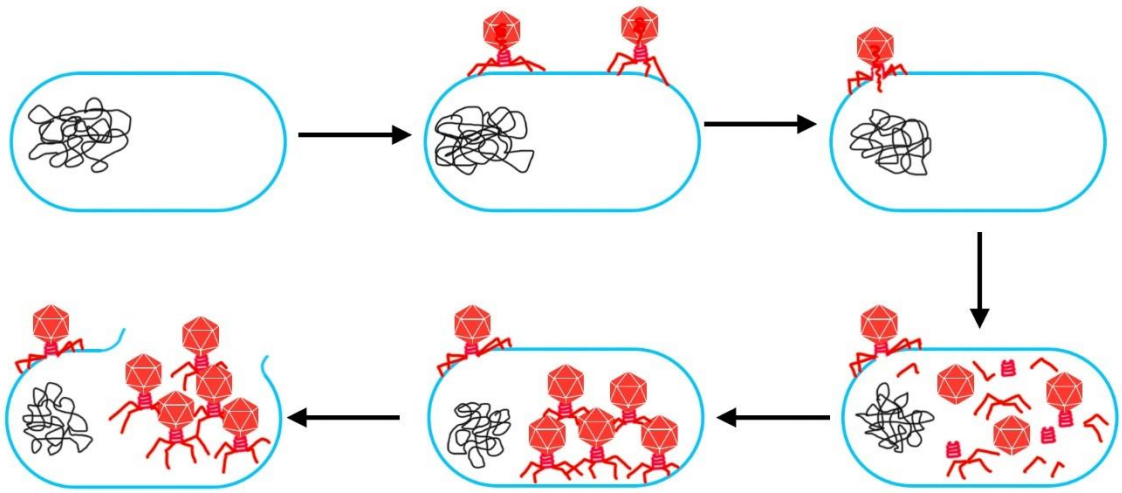
Tablica 1. Ključne razlike u građi bakterija i arheja [10]

Građa	Bakterije	Arheje
Lipidi	Fosfolipidi na bazi glicerola	Fosfolipidi na bazi glicerola, ali različite stereokemije od eukariota i bakterija
Membrane	Od lipida glicerol estera	Od lipida glicerol etera
Stanični zid	Peptidoglikan i S-sloj	Sadrži proteine površinskog sloja ili S-sloj, nedostatak peptidoglikana
Bič	Nalik Tip III pili	Nalik Tip IV pili
Kromosom	Jedan kružni kromosom	Jedan kružan bič

Gljive su, zajedno sa biljkama i životinjama, jedna od podvrsta eukariota. Nisu fotosintetski organizmi, a njihova se stanična stijenka sastoji od hitina. Na slikama svjetle mikrografije prikazane su plave stanice gljiva, gdje dugi lanac stanica tvori središnju nit na koju su pričvršćene nakupine sferičnih stanica. Svaka od tih stanica, veličine oko 5 µm, sadrži jezgru. Gljive su fizički veći eukariotski mikroorganizmi i imaju najveću biomasu među mikroorganizmima. Procjenjuje se da postoji oko 1,5 milijuna vrsta gljiva, iako je do sada poznato samo 7% njih.

Praživotinje (protozoe) mikroskopski su jednostanični eukarioti, relativno složene unutarnje strukture, od kojih neke formiraju kolonije. Razmnožavaju se spolno (gametogamija, samooplodnja, konjugacija) i nespolno (pupanje, binarna i višestruka dioba). Protozoe su ovisne o vodi, pa se najčešće nalaze u slatkovodnim i morskim staništima i vlažnim tlima na kopnu, a neke nastanjuju probavni trakt životinja. Poznato je više od 50.000 vrsta protozoa, koje žive u gotovo svim mogućim staništima, a većina ih živi slobodno [11, 13].

Virusi su patogeni na granici između živog i neživog, koji nemaju staničnu građu, već su acelularni [14]. Sastoje se od genetskog materijala zabilježenog u DNK ili RNK zatvorenog u proteinsku ljusku, odnosno kapsidu, koja može biti različite veličine i oblika [11]. Razmnožavaju se unutar živih stanica, ali ne mogu se uzgajati na hranjivoj podlozi. Virus se najprije pričvršćeni na bakterijsku stanicu i ubacuje svoj genetski materijal u njezinu unutrašnjost. Unutar stanice, virus preuzima kontrolu nad staničnim procesima i usmjerava ih prema proizvodnji novih virusnih čestica. Kada se nakupi dovoljno novih virusa, bakterijska stanica puca i oslobađa ih u okolinu. Novi virusi tada mogu napasti druge stanice i započeti isti ciklus ispočetka. Proces razmnožavanja virusa prikazan je slikom 2.



Slika 2. Ciklus razmnožavanja virusa [14]

Poznati su mnogi virusni uzročnici bolesti, uključujući herpes, bjesnoću, dječju paralizu, AIDS, rotavirus, gripu, denga groznicu te aktualni SARS-CoV-2 virus koji uzrokuje COVID-19 [10]. Dodatne bolesti uzrokovane mikroorganizmima prikazane su Tablicom 2.

Tablica 2. Bolesti uzokovane mikroorganizmima [10]

Zarazne bolesti	Mikroorganizmi koji ih uzrokuju	Vrsta mikroorganizma
hripavac	*Bordattella pertussis*	bakterija
bubonska kuga	*Yersinia pestis*	bakterija
tuberkuloza	*Mycobacterium tuberculosis*	bakterija
dermatofitija	*Trichophyton rubum*	gljivica
atletsko stopalo	*Trichophyton mentagrophytes*	gljivica

Mikrobiom čine skupine mikroorganizama poput bakterija, gljivica i virusa koji stvaraju kolonije. Oni su prisutni u ljudskom organizmu, na površinama izloženim okolišu te se vjeruje da su mnogobrojniji u odnosu na ljudske stanice. Danas su mikroorganizmi u velikoj mjeri prisutni u industriji, posebno u procesima detoksikacije (pročišćavanja) opasnog otpada. Mikroorganizmi i njihovi enzimi ključni su za razgradnju organskih tvari u otpadnim vodama. Oni imaju važnu ulogu u ekološkim procesima, jer omogućuju obnavljanje osnovnih elemenata poput ugljika (C), kisika (O) i dušika (N), koji su esencijalni za sve oblike života, kao i za hranjive tvari, koje su dostupne raznim metaboličkim procesima mikroba. Razvoj civilizacije i tehnološki napredak dovode do pojave novih mikroorganizama, a samim time i pandemija. Primjeri toga uključuju bolesti kao što su kolera, kuga, te nedavni razvoj pandemije izazvane virusom SARS-CoV-2 [10].

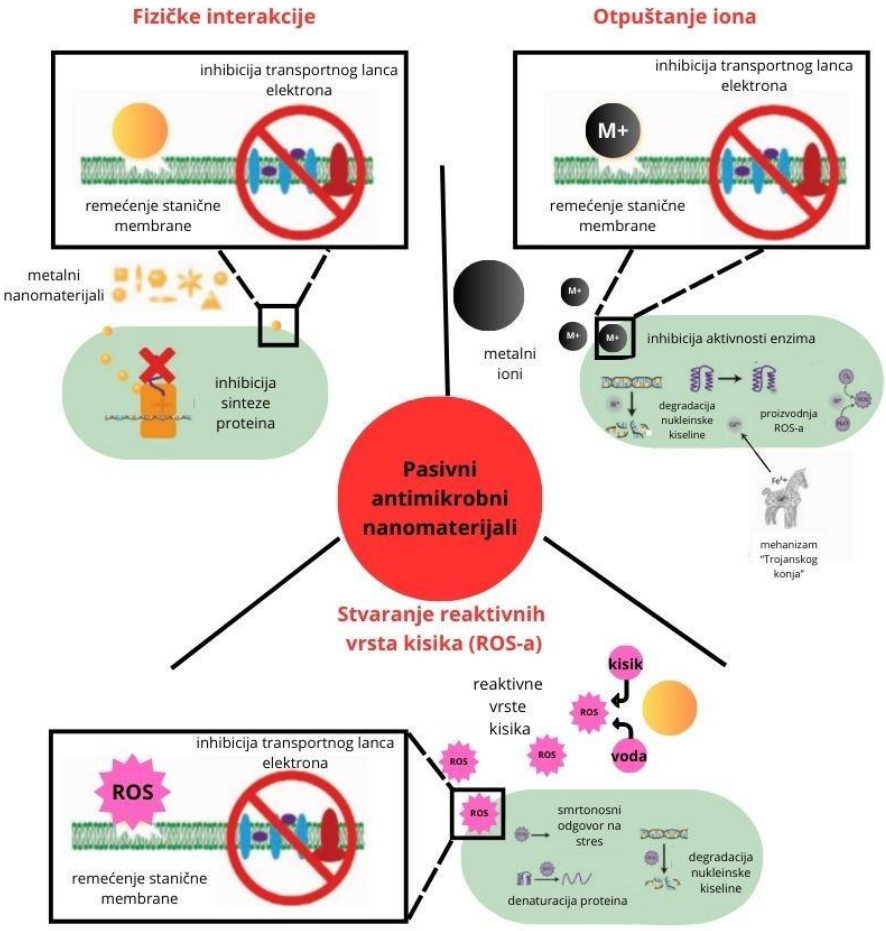
2.2. Antimikrobna zaštita

Antimikrobna zaštita ključan je faktor u očuvanju zdravlja, prevenciji infekcija te smanjenju širenja rezistentnih mikroorganizama. Antimikrobni zaštitni materijali, poput fotokatalitičkih antibakterijskih slojeva, pružaju antibakterijska i antivirusna svojstva, čime se osigurava zaštita okoliša bez toksičnih nusprodukata. Njihova uloga je inhibirati rast širokog spektra patogena, bilo izravnim uništavanjem mikroorganizama, čime se onemogućava njihovo širenje, ili ometanjem njihova rasta, razvoja i formiranja biofilma [1]. Razvoj takvih materijala, uključujući metalne prevlake, ključan je za borbu protiv infekcija uzrokovanih biofilmom. Neke metalne prevlake, poput onih od bakra, pokazuju značajna antibakterijska svojstva. Bakarovo antimikrobno djelovanje očituje se mehanizmima, koji uključuju otpuštanje metalnih iona, što izaziva oksidacijski stres i stvaranje vodikovog peroksida, te uništavanje staničnih membrana, što uzrokuje smrt mikroorganizama. Bakar također uzrokuje vezivanje za proteine koji ne zahtijevaju bakar, što dovodi do gubitka funkcije tih proteina i njihove razgradnje. Znanstvenici vjeruju da povišena koncentracija bakra može uzrokovati oksidacijski stres i stvaranje vodikovog peroksida, pri čemu dolazi do oksidativnog oštećenja stanice poznatog kao Fentonov tip reakcije. Osim bakra, drugi metali poput cinka, srebra, titanija te polimeri poput polimetakrilata, također pokazuju antimikrobna svojstva [15].

Iako antimikrobni materijali učinkovito djeluju protiv bakterija i gljiva, njihova učinkovitost protiv virusa predstavlja izazov. Virusi su prirodno otporni na antibiotike, budući da još ne postoji antibiotik koji može suzbiti virusno razmnožavanje, odnosno inhibirati replikaciju, bez štetnog utjecaja na stanice domaćina [11]. Stoga, antimikrobna zaštita mora uključivati

razne postupke, kao što su uklanjanje zaraženih površina, uništavanje zaštitnih matrica, poremećaj staničnih membrana i otpuštanje iona s antimikrobnim djelovanjem. S obzirom na ove izazove, razvoj novih metoda antimikrobne zaštite postaje ključan. Nove tehnologije moraju zadovoljavati nekoliko važnih kriterija, uključujući brzo djelovanje, efikasnost u suzbijanju patogena, sposobnost kontrole vremenske i prostorne isporuke, selektivnost prema patogenima te nisku ili nepostojanu citotoksičnost i druge štetne nuspojave. Metalni nanomaterijali, kao gore naveden bakar, su se pokazali iznimno učinkovitim u zadovoljavanju tih kriterija, jer omogućuju preciznu terapiju koja cilja specifične stanične komponente, poput membrana, enzima, nukleinskih kiselina i proteina vezanih za membranu [2].

Još uvijek nije potpuno razjašnjen točan mehanizam antiviralnog i antimikrobnog djelovanja metalnih nanomaterijala, no molekulsko modeliranje daje uvid u reakcije između mikroorganizama i materijala. Pomoću teorijskih metoda kao što su simulacije molekularne dinamike (MD), kvantni proračuni (QM) i tehnike strojnog učenja (ML), istražuju se interakcije između mikroba i nanomaterijala, što doprinosi boljem razumijevanju njihovih antimikrobnih svojstava [2].



Slika 3. Shematski dijagram raspona antimikrobnih mehanizama metalnih nanomaterijala uključujući fizikalne interakcije i proizvodnju reaktivnih vrsta kisika [2]

Slika 3. prikazuje antimikrobno djelovanje metalnih nanomaterijala kroz nekoliko mehanizama. Prvo, izravnim fizičkim kontaktom oštećuju staničnu membranu bakterija i ometaju sintezu proteina. Osim toga, oslobađaju metalne ione koji remete enzimsku aktivnost i uzrokuju degradaciju nukleinskih kiselina. Također, potiču stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što dovodi do oksidativnog stresa, denaturacije proteina i, u konačnici, stanične smrti. Zahvaljujući ovim mehanizmima, metalni nanomaterijali učinkovito sprječavaju rast i razmnožavanje mikroorganizama [2].

2.3. Rizici prekomjerne uporabe antibiotika

Mikroorganizmi su uzročnici najzaraznijih poznatih bolesti. Otkriće antimikrobnih agensa pomoglo je u sprječavanju razvoja novih vrsta bolesti, no sa godinama i prekomjernom upotrebom, u borbi za opstanak, mikroorganizmi su stekli otpornost na već poznate antibiotike. Danas antimikrobna rezistencija predstavlja veliki problem [16].

Antimikrobna rezistencija je mogućnost mikroorganizma da se odupre efektu antimikrobnog agensa, kao što je antibiotik, te opisuje rezistenciju na antibiotike. Faktori koji utječu na rezistentnost su promjena karakteristika mikroorganizama, selektivan pritisak korištenja antimikrobnih lijekova te društvene i tehnološke promjene koje pospješuju razvoj i prijenos mikroorganizama otpornih na lijekove [16]. Antimikrobna otpornost nastaje kada mikroorganizmi, poput bakterija, virusa, gljivica i parazita, evoluiraju i razviju sposobnost izbjegavanja učinka antimikrobnih lijekova, što čini liječenje infekcija težim i povećava rizik od prijenosa ozbiljnih bolesti i smrti. Više od 70% mikroba koje uzrokuju infekcije otporno je na jedan ili više antimikrobnih sredstava koja se koriste za liječenje infekcija [17]. Otpornost se može podijeliti u dvije grupe: prirodna i stečena otpornost. Prirodna otpornost je ona vrsta otpornosti, gdje je bakterija prirodno otporna na antimikrobni agens kao rezultat prilagodbe, koja nije nužno svojstvena određenoj vrsti antimikroba. Stečenu otpornost uzrokuju mutacije gena, točnije kromosoma ili stečeni mobilni elementi zaslužni za transport rezistentnih gena [16].

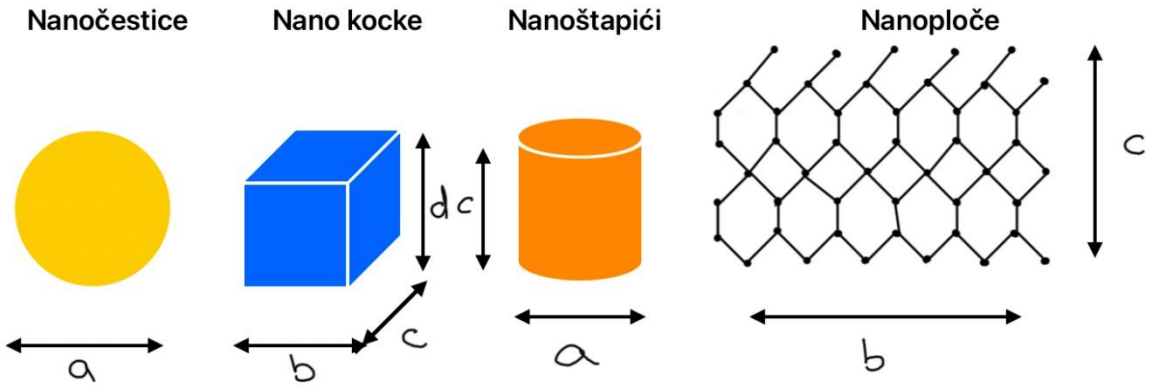
Poznati su i različiti mehanizmi otpornosti mikroorganizama na lijekove. Neki od mehanizama su zaustavljanje djelovanja antibiotika, zaštita ribosoma, formiranje biofilma, modificiranje mete te smanjenje permeabilnosti antimikrobnih agensa. Također, mogu djelovati tako da degradiraju ili izmjenjuju komercijalni antibiotik, smanjuju propusnost membrana i biološki diferenciraju ciljano mjesto antibiotika. Dok se bakterije s jednim mehanizmom otpornosti još mogu liječiti antibioticima, sve je češća pojava sojeva koji istovremeno posjeduju više mehanizama, čime se značajno smanjuje učinkovitost terapije. Razumijevanje navedenih mehanizama bitno je kako bi se održala korisnost postojećih agensa te pri dizajnu novih antimikrobnih agensa otpornih na već postojeće i nepoznate mehanizme otpornosti [2].

Prekomjerna upotreba antibiotika dovodi do stvaranja rezistentnosti mikroorganizama čime oni postaju manje učikoviti, što ih čini jednim od glavnih prijetnji ljudskom zdravlju. Svake godine gotovo 5 milijuna ljudi umre kao posljedica rezistencije bakterijskih infekcija prema antimikrobnoj terapiji. ESKAPEE patogeni (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp*. i *Escherichia coli*) zaslužni su za 70% smrti povezanih sa rezistencijom na antibiotike [18].

S obzirom na globalnu situaciju, sve je veća zabrinutost zbog kontrole patogena otpornih na više lijekova (MDR) u prevenciji zaraznih bolesti. Osim toga, široko rasprostranjena zaraženost među pacijentima i prekomjerna uporaba lijekova, što može dovesti do stvaranja biofilma, doprinosi nastanku nozokomijalnih infekcija koje su otpornije na konvencionalne tretmane. Brzi napredak nanoznanosti i nanotehnologije pokazao je obećavajući potencijal za stvaranje novih biocidnih agenasa koji se mogu integrirati s biomaterijalima kako bi se spriječila kolonizacija bakterija i stvaranje biofilma [17].

2.4. Primjena nanočestica metala u antimikrobnoj zaštiti

Kao što je prethodno spomenuto, metalni nanomaterijali pokazali su izuzetnu učinkovitost u antimikrobnoj zaštiti. Veličina nanočestica također igra ključnu ulogu, jer povećanjem površine, raste sposobnost prihvaćanja i prodiranja u staničnu membranu bakterije. Bakterijsko djelovanje je učinkovitije što je čestica manja. Negativno nabijena površina privući će pozitivno nabijene nanočestice, koje, zbog elektrostatike, pokazuju veću učinkovitost u vezivanju za bakterijsku stanicu u odnosu na negativno nabijene nanočestice. Oralni put primjene pokazao se kao najbolji zbog najsigurnije, neinvazivne primjene, iako ima nedostatke poput niske bioraspoloživosti, brze metaboličke razgradnje, prisutnosti sluzi i enzima te kemijskog okruženja. Najučinkovitiji način primjene je intravenski, jer pruža 100%-tnu bioraspoloživost, nadjačava prvi prolaz metabolizma te je ponovljiv, ali zahtijeva osposobljene stručnjake i uključuje bolan postupak ubrizgavanja [7]. Shematski prikaz oblika nanomaterijala dan je slikom 4. i dijeli oblike u četiri različite skupine: nanočestice, nano kocke, nanoštapiće i nanoploče. Peti mogući oblik su nanopiksele, koji nisu prikazani slikom [2].

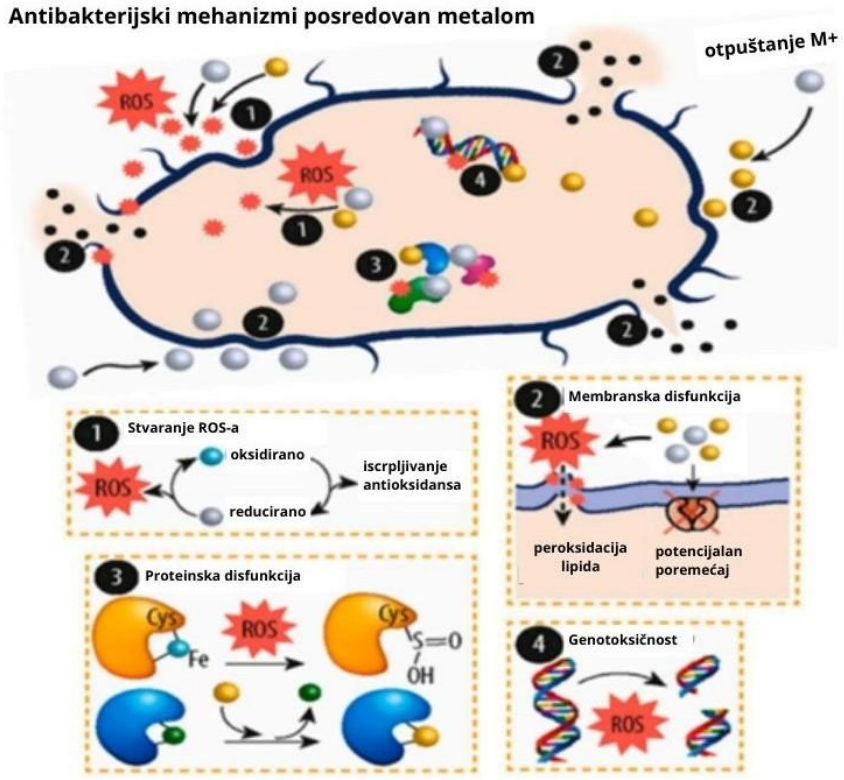


Slika 4. Shematski prikaz oblika nanomaterijala koji posjeduju pasivnu antimkrobnu aktivnost [2]

Nanočestice izazivaju toksični učinak putem dva glavna mehanizma, koji su usko povezani i često se događaju istovremeno: narušavanje membranskog potencijala i strukture, te stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, pri čemu su same nanočestice nanokatalizatori. Oštećenje membrane događa se kada nanočestice elektrostatički interagiraju s bakterijskim staničnim stijenkama i membranama, što dovodi do promjena u membranskom potencijalu, depolarizacije i gubitka strukturalnog integriteta. To uzrokuje neravnotežu u transportu, oštećenje disanja, prekid energije konverzije i na kraju smrt stanice. Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, koji su ključni za toksičnost, provodi se ili neizravno zbog narušavanja respiratornog lanca, ili izravno od strane samih nanočestica. Porast reaktivnih kisikovih vrsta uzrokuje oksidativni stres, oštećujući makromolekule stanice poput lipida, proteina, RNK i DNK. Visoke razine reaktivnih kisikovih vrsta izazivaju smrt stanice, dok niže razine dovode do oštećenja DNK i mutacija [19].

Metali poput srebra, bakra i cinka, s prirodnim antimikrobnim svojstvima, posebno su učinkoviti u nanoskali, nudeći širok spektar antimikrobne aktivnosti uz minimalnu toksičnost za ljude. Osim toga, drugi metali poput aluminija, arsena, kadmija i željeza također pokazuju antimikrobna svojstva. Ove nanočestice vrlo su učinkovite protiv patogena otpornih na konvencionalne tretmane zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradivosti, proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, visoke apsorpcije bliske infracrvenom zračenju te fotodinamičkih i fototermalnih mehanizama. Uloga nanotehnologije u biomedicinskim primjenama, uključujući terapije temeljene na matičnim stanicama, liječenje neurodegenerativnih bolesti, terapiju raka i isporuku gena, također se istražuje. Međutim, izazovi ostaju, jer nanomaterijali mogu narušiti vitalnost stanica, oštetiti mitohondrijske funkcije, povećati oksidativni stres i utjecati na ekspresiju proteina krvno-moždane barijere in vivo. Prema tome razvoj novih biomaterijala koji inhibiraju rast mikroba i imaju nisku toksičnost od velike je važnosti [17].

Slika 5. prikazuje antibakterijski mehanizam djelovanja metalnih iona i nanočestica. Prvi korak je formiranje izvanstaničnih i unutarstaničnih reaktivnih vrsta kisika, a drugi korak sastoji se od interakcije reaktivnih vrsta kisika i nanočestica sa staničnom stijenkom. Koraci tri i četiri predstavljaju interakciju sa DNK i proteinima [5].

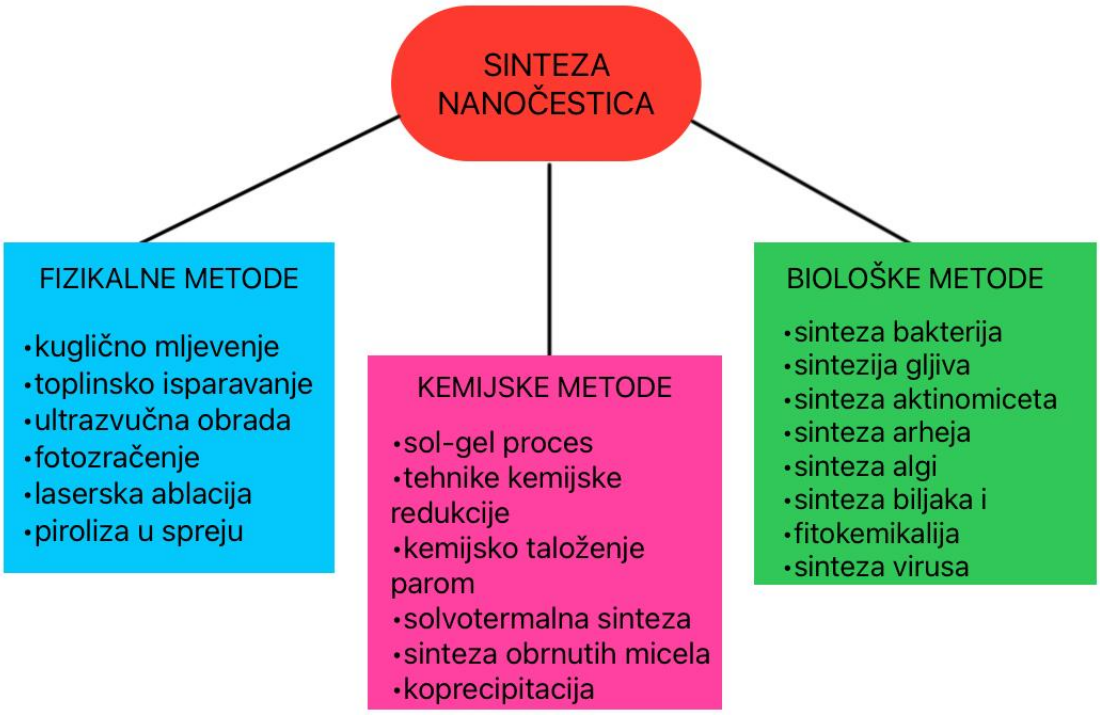


Slika 5. Shematski prikaz antimikrobnog djelovanja metalnih iona i nanočestica [5]

2.5. Postupci pripreme nanočestica temeljeni na principima zelene kemije

Nanotehnologija je brzorastuća znanstvena disciplina koja se bavi nanočesticama, odnosno česticama veličine od 1 do 100 nm, koje posjeduju posebna fizikalna i kemijska svojstva. Smatra se da su nanočestice prisutne u okolišu od njegova nastanka, uključujući tlo, vodu, minerale i vulkansku prašinu, no također ih možemo sintetizirati i u laboratorijskom okruženju. Nanočestice se dijele na organske i anorganske. Organske nanočestice obuhvaćaju polimerne nanočestice, nanonosače na bazi lipida, liposome, te čvrste lipidne nanočestice. Anorganske nanočestice uključuju metalne okside, poput srebrovog oksida i cinkovog oksida. Srebrne nanočestice poznate su po svojim antibakterijskim i antivirusnim svojstvima [3].

Sinteza nanočestica može se provesti pomoću tri osnovne metode: fizikalne, kemijske i biološke metode [3]. Podjela je bliže objašnjena shematskim prikazom na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz metoda sinteze nanočestica [3]

Najčešća kemijska metoda sinteze uključuje redukciju nanočestica iz metalnih soli uz pomoć reducirajućih agenasa poput $NaBH_4$, CH_2O, PVP, i $C_7H_8O_4S$. Ove kemijske metode su ekonomične, ali korištenje opasnih kemikalija i toksičnih nusprodukata nije u skladu sa principima zelene kemije. Kako bi se smanjili ekološki i zdravstveni rizici, razvijaju se nove tehnike koje zamjenjuju konvencionalne metode s netoksičnim, pouzdanim i ekološki održivim pristupima [20]. Najbolji ekološki pristupi temelje se na biološkim metodama, koje uključuju korištenje biljaka, biljnih proizvoda, algi, gljiva, bakterija, virusa i kvasaca. Parametri kao što su vrijeme reakcije, koncentracija reaktanta, pH, temperatura i koncentracija soli mogu značajno utjecati na sintezu biološkim putem [3].

Mokra kemijska redukcija je metoda koja omogućuje jednostavnu kontrolu sinteze nanočestica, no koristi ekološki i biološki opasne reducirajuće agense i organska otapala. U skladu s principima zelene kemije, rad na eliminaciji opasnih supstanci u kemijskim procesima postaje ključan [20]. Bakrova toksičnost povezana je s prisutnošću slobodnih Cu^{2+} iona u koncentracijama manjim od onih koje inhibiraju rast bakterija, što upućuje na važnost korištenja nanočestica bakra u odnosu na bakrene soli. Dva osnovna mehanizma za antimikrobno djelovanje bakrovih nanomaterijala uključuju prodiranje bakrovih iona kroz staničnu membranu bakterije, što izaziva oštećenja membrane, proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i degradaciju DNK. Drugi mehanizam uključuje proizvodnju ROS izvan stanice, što uzrokuje zaustavljanje disanja i oštećenje DNK s minimalnim narušavanjem membrane stanice. Također, bakrove nanočestice mogu inhibirati učinkovite pumpe za izbacivanje u bakterijama i gljivama [3]. Do toga dolazi kada bakterije ili gljivice dođu u kontakt s bakrovim nanočesticama, koje mogu ometati ili blokirati rad njihovih pumpi za izbacivanje. To znači da se toksične tvari koje bi inače bile izbačene iz stanice zadržavaju unutar nje, što može dovesti do smrti stanice ili smanjenja njenog rasta.

Biljni ekstrakti, posebno oni bogati antioksidacijskim spojevima, mogu poslužiti kao sredstva za redukciju i stabilizaciju u sintezi metalnih nanomaterijala, poput bakra. Ekološki prihvatljive metode za sintezu bakrovih nanomaterijala uključuju korištenje biljnih ekstrakata poput onih iz *Magnolia kobus* i *Euphorbia esula*. Također, ekstrakti plodova *Vaccinium myrtillus* (borovnica) i *Vaccinium uliginosum* (lažna borovnica), poznati po visokom sadržaju fenolnih spojeva i antocijana, mogu biti učinkoviti u sintezi bakrovih nanomaterijala. Biološki pristupi sintezi metalnih nanomaterijala predstavljaju ekološki prihvatljiviju i jeftiniju alternativu konvencionalnim kemijskim i fizičkim metodama [21].

U sintezi nanočestica često se koriste dvije glavne metode: "top-down" i "bottom-up". "Top-down" metode obično uključuju fizičke tehnike, dok "bottom-up" pristupi koriste kemijske i biološke procese. Popularne tehnike uključuju kemijsku redukciju, ko-precipitaciju, mikroemulziju, sol-gel sintezu, hidrotermalne metode i biološke tehnike koje upotrebljavaju biljke ili mikroorganizme. Iako fizičke metode zahtijevaju uvjete visoke energije, tlaka ili temperature, biološki pristupi nude

ekološki prihvatljiviju i jeftiniju alternativu korištenjem prirodnih agenata, poput biljnih ekstrakata ili enzima. Funkcionalizacija nanočestica s polimerima, proteinima ili drugim materijalima može poboljšati njihovu stabilnost i svojstva. Bakrove nanočestice pokazuju potencijal, ali njihova niska stabilnost i visoka reaktivnost pod atmosferskim uvjetima mogu predstavljati izazove. Zeleni pristupi sintezi koristeći biološke agente pomaže u prevladavanju tih problema i proizvodnji stabilnijih nanočestica, čime se poboljšava njihova antimikrobna aktivnost [5].

2.6. Deponiranje nanočestica na površinu materijala

Deponiranje nanočestica na površinu materijala može značajno poboljšati antimikrobna svojstva tih materijala, omogućujući inhibiciju mikrobne adhezije te uništavanje mikroorganizama prilikom kontakta [1]. Priprema površine ključna je za uspješno deponiranje nanočestica. To uključuje smanjenje konkavnosti površine poliranjem i prilagodbu fizičkih svojstava poput slobodne energije površine. Površina se prvo polira, zatim ultrazvučno čisti acetonom i destiliranom vodom te konačno deioniziranom vodom. Proces deponiranja uključuje upotrebu otopine metalnih iona kojoj su dodane soli, snažna oksidacijska sredstva i katalizatori poput natrijevog persulfata na natrijev perklorat, a zatim se otopina inkubira kako bi se omogućilo taloženje nanočestica [22].

Nanočestice nanesene na površinu mogu utjecati na njena svojstva, uključujući promjenu hrapavosti, gustoću aktivnih mjesta nukleacije i kut kontakta [22]. Osim toga, dodavanje nanočestica u tekućine može modificirati njihova fizička svojstva, poput specifičnog toplinskog kapaciteta, površinske napetosti, toplinske vodljivosti i viskoznosti, kao i hidrodinamiku u blizini površine. Ti učinci ovise o koncentraciji nanočestica te njihovim karakteristikama poput veličine, oblika, prevlaka i kemije površine, koje je potrebno prethodno optimizirati. Svojstva poroznog sloja nastalog od nanočestica, poput strukture i debljine, ovise o uvjetima kao što su temperatura površine, toplinski tok i brzina isparavanja. Istraživanje uvjeta koji utječu na stvaranje poroznog sloja ključno je za smanjenje ili uklanjanje njegovih negativnih učinaka na taloženje nanočestica [23].

Porozni sloj nanočestica na površini ima dva glavna učinka. Prvi je promjena hrapavosti površine, što utječe na gustoću aktivnih mjesta nukleacije, a drugi je promjena ravnoteže sila na trostranoj liniji, uključujući navlaživanje površine i kutove kontakta tijekom napredovanja i povlačenja tekućine. Hrapavost površine nakon taloženja nanočestica pokazuje ovisnost o koncentraciji i karakteristikama nanočestica, kao i izvornom stanju hrapavosti površine. Nanočestice mogu povećati gustoću mjesta nukleacije ispunjavanjem većih šupljina na površini, ali kada njihova veličina postane slična hrapavosti površine, gustoća mjesta nukleacije značajno opada. Ovi međusobno povezani učinci, gdje hrapavost utječe na početak nukleacije, a navlaživanje kontrolira aktivaciju tih mjesta, ukazuju na kompleksnu interakciju između strukture poroznog sloja i svojstava površine. Promjene hrapavosti površine nakon taloženja nanočestica također utječu na navlaživanje, koje se mjeri kutovima kontakta [23].

2.7. Svojstva antimikrobnih površina

Prema načinu tvorbe antimikrobnih površina, one se dijele u četiri glavne skupine: površine s uzorkom, funkcionalizirane površine, supervlažne površine i pametne površine. Supervlažne površine dodatno se dijele na superhidrofobne i superhidrofilne površine [1].

Kod površina s uzorkom, površina je fizički modificirana tako da mikroorganizmi nisu u mogućnosti doći u doticaj s površinom zbog steričkih smetnji, ili su uništeni uslijed prodiranja površinskih značajki. Biocidna učinkovitost takvih površina ovisi o njihovoj topografiji i vrsti mikroorganizama. Mehanizam djelovanja uključuje pucanje stanica mikroba nakon što one prodru u površinu, što rezultira njihovom smrću. Na slici 7. prikazan je antimikrobni sloj, koji otpušta biocidne tvari i reaktivne vrste kisika. Slika 7. prikazuje način djelovanja antimikrobnog premaza koji sprječava rast bakterija oslobađanjem biocidnih tvari i reaktivnih vrsta kisika (ROS). U prvom koraku, bakterije dolaze u kontakt s površinom i počinju se vezivati. Zatim, premaz reagira na prisutnost bakterija te oslobađa ROS, koji djeluju destruktivno na njihove stanične strukture. U završnoj fazi, ROS i biocidne tvari oštećuju bakterijske membrane, uzrokujući njihovu smrt i sprječavajući daljnje širenje mikroorganizama. Ovaj mehanizam omogućuje dugotrajnu zaštitu površine od bakterijske kontaminacije, što je posebno važno u medicini, industriji i svakodnevnoj higijeni [4].



Slika 7. Shematski prikaz mehanizma antimikrobnog sloja koji otpušta biocidne stanice i reaktivne vrste kisika [4]

Njegova učinkovitost nije jednaka kod mikroorganizama s debljom staničnom stijenkom i onih s dodatnim membranama [1].

Funkcionalizirane površine kemijski su modificirane kako bi se inhibirala interakcija mikroorganizama s površinom ili uništili mikroorganizmi prilikom kontakta. Ove površine koriste neispirajuće materijale, koji osiguravaju trajnu biocidnu aktivnost direktnim kontaktom s mikroorganizmima. Površine s polikationskom funkcionalizacijom ostvaruju elektrostatsku interakciju između stanične membrane mikroorganizama i površine materijala, što dovodi do poboljšane adsorpcije negativnog naboja s površine mikroba, a rezultira gubitkom funkcionalnosti genetskog materijala mikroorganizama. Takve su površine učinkovite protiv širokog spektra gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, virusa te gljivica. Njihova učinkovitost ovisi o faktorima kao što su molarna masa polimera, dužina alkilnog lanca polikationa i gustoća naboja. Osim kemijske funkcionalizacije, antimikrobne površine mogu se aktivirati i fizikalnim metodama, poput fototermalne terapije. Ova metoda temelji se na lokalnom zagrijavanju pomoću fototermalnog sredstva, koje se aktivira izlaganjem svjetlosti odgovarajuće valne duljine. Takvo zagrijavanje izaziva hipertermiju, što dovodi do smrti mikroorganizama kroz procese poput denaturacije proteina, pucanja stanične membrane ili isparavanja stanične tekućine [1].

Supervlažne površine zahtijevaju kombinaciju fizikalnih i kemijskih modifikacija. Nastanak biofilma na vanjskim površinama započinje vezanjem mikroorganizama na površinu. Ključ za kontrolu razvoja biofilma leži u stvaranju antiadhezijske površine koja smanjuje kontakt mikroorganizama i podloge. Ove površine mogu se stvoriti poboljšanjem vlažnosti materijala. Dijele se na superhidrofilne i superhidrofobne površine, pri čemu obje vrste zahtijevaju specifične kemijske i strukturne prilagodbe. Superhidrofobna površina definira se kutom kontakta s vodom većim od 150 stupnjeva, što omogućuje lako klizanje kapljica vode čak i pri malim nagibima. Takve površine učinkovite su protiv širokog spektra mikroorganizama zahvaljujući smanjenju mogućnosti prianjanja mikroba. Suprotno tome, superhidrofilne površine imaju kut kontakta s vodom manji ili jednak 5 stupnjeva, pri čemu kapljice vode ravnomjerno prekrivaju površinu, stvarajući tanak sloj vode. Ovaj sloj sprječava kontaminaciju izloženog područja i omogućava samoočišćenje [1, 17, 23, 24].

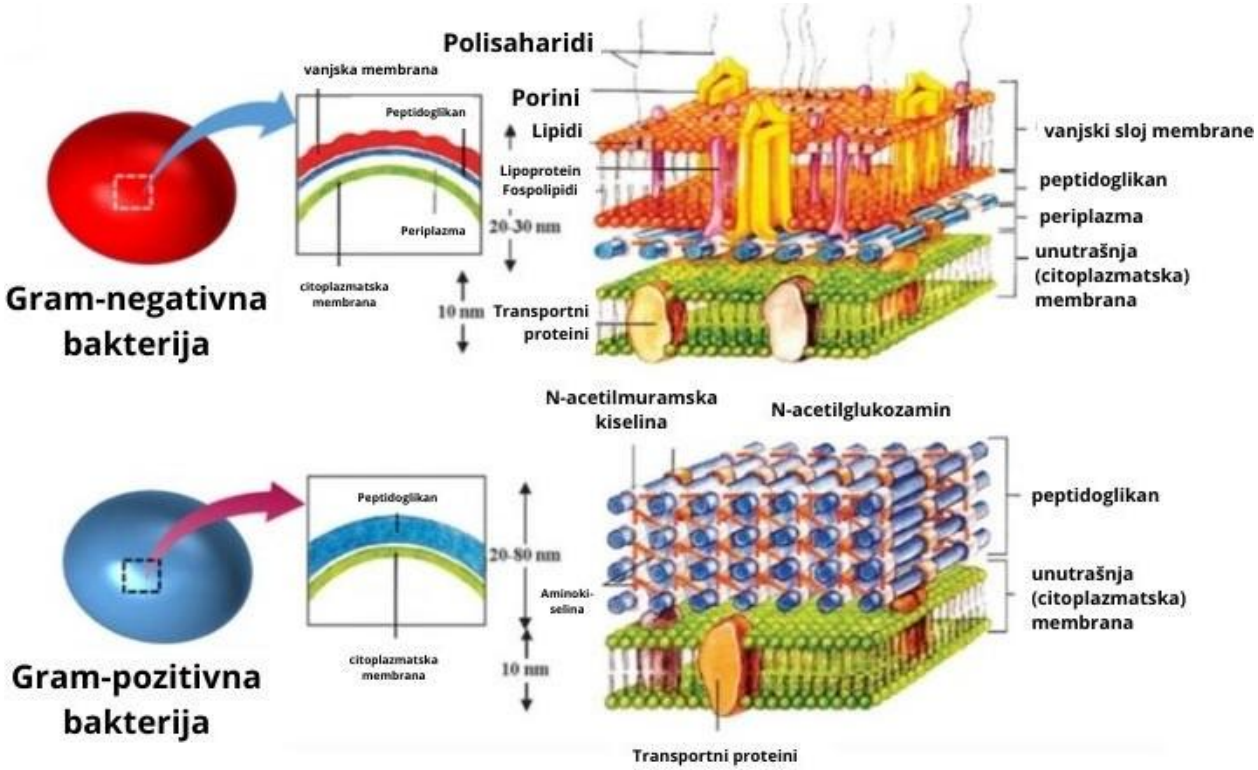
Pametne površine djeluju na način da istovremeno uništavaju mikroorganizme i inhibiraju njihovo daljnje širenje. Njihova tvorba uključuje ugradnju biocidnih sredstava i polimera osjetljivih na podražaje kako bi se spriječilo obrastanje. Ove površine uništavaju mikroorganizme koristeći različite antimikrobne agense, koji se otpuštaju putem polimera koji reagiraju na specifične podražaje [1].

2.8. Interakcija mikroorganizama i površina

Mikroorganizmi se pričvršćuju na čvrste površine, što dovodi do adsorpcije, kolonizacije i formiranja biofilma. Tijekom ovog procesa dolazi do biološke promjene u mikroorganizmu i stvara se izvanstanična matrica (ECM), čiji sastav ovisi o vrstama unutar nje i uvjetima rasta [1].

Polisaharidi, proteini i izvanstanični DNK uglavnom grade ECM u bakterijama, štiteći slobodne bakterije i pomažući u genetskoj razmjeni. Kod gljivica, ECM pomaže u otporu prema antifungalnim sredstvima i djeluje kao barijera protiv kemijskih i bioloških agenasa. U virusima, ECM olakšava prianjanje ciljne stanice i ulazak u stanice domaćina. Bitan korak kod formiranja biofilma je pričvršćivanje mikroba, pa je razumijevanje interakcije stanice sa površinom bitno za kontrolu razvoja biofilma. Površinski naboj i vlažnost značajno utječu na te interakcije. Bakterije su najčešće negativnog naboja kojem pridonosi naboj teihoinske kiseline u peptidoglikanu unutar gram-pozitivne bakterije, dok u gram-negativnim bakterijama naboju pridonose fosfolipidi i lipopolisaharidi. Slično tome, gljivice i virusi također imaju negativne naboje na svojim površinama. Hidrofobnost također ima veliku ulogu u prianjanju mikroba koje omogućavaju velike količine hidrofobne aminokiseline [1].

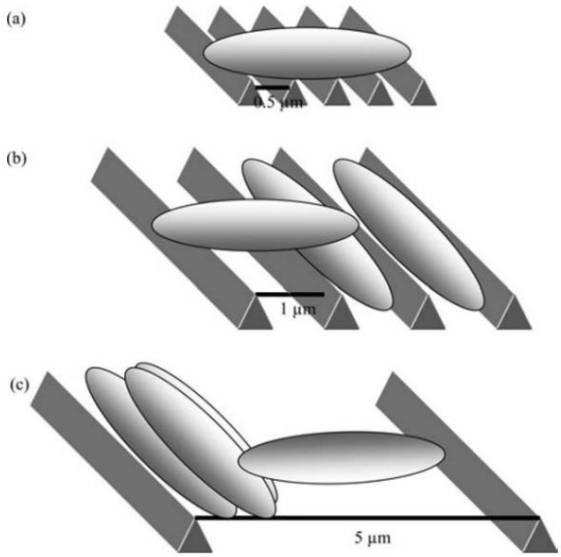
Struktura gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija prikazana je slikom 8. Gram-pozitivne i gram-negativne bakterije razlikuju se po strukturi staničnog zida, što utječe na njihovo obojenje i osjetljivost na antibiotike. Gram-pozitivne bakterije imaju deblji sloj peptidoglikana, koji im daje čvrstoću i omogućava zadržavanje kristal-ljubičaste boje pa pod mikroskopom izgledaju ljubičasto. Nemaju vanjsku membranu, što ih čini osjetljivijima na antibiotike koji ciljaju sintezu staničnog zida. Gram-negativne bakterije, s druge strane, imaju tanji sloj peptidoglikana, ali i dodatnu vanjsku membranu koja im pruža zaštitu i otežava ulazak antibiotika. Zbog toga su otpornije na određene terapije. U Gramovom bojenju ne zadržavaju primarnu boju, već poprimaju crvenu ili rozu nijansu [4].



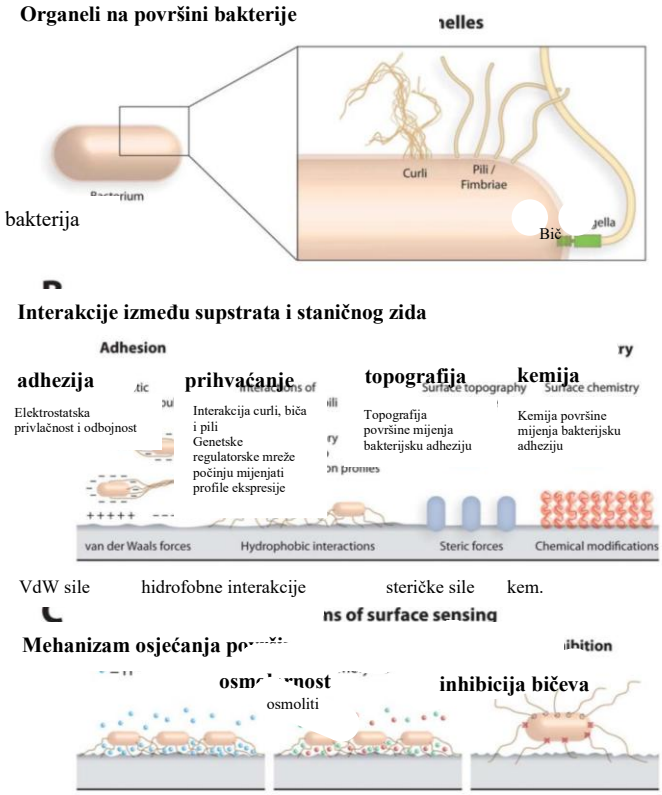
Slika 8. Shematski prikaz strukture gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija [4]

Prihvaćanje bakterija za površinu ima brojne prednosti koje pospješuju njihov rast i preživljavanje, osobito u uvjetima siromašnim hranjivim tvarima. Kada se bakterija prihvati za površinu, organski sloj suspendiran u tekućini se taloži, stvarajući lokalnu koncentraciju hranjivih tvari koja podržava rast bakterija. Dodatno, povećanje površine podloge, kao što je dodavanje staklenih kuglica, omogućava veću površinu za adsorpciju hranjivih tvari, što omogućuje bakterijama da prežive u uvjetima u kojima bi razine hranjivih tvari inače bile nedovoljne za rast. Izvanredan primjer je *Caulobacter crescentus*, koji oscilira između staničnih oblika s drškama koje čvrsto prianjaju uz površine i pokretnih stanica s polarnim bičevima. Ova sposobnost omogućava bakteriji da se prilagodi okolišima s različitom dostupnošću hranjivih tvari. Osim što olakšava unos hranjivih tvari, površinsko prianjanje također omogućava nekim bakterijama da izravno preuzmu potrebne metabolite i kofaktore s površina na kojima se nalaze, kao što je to slučaj s vrstama poput *Shewanella*, koje mogu koristiti metale poput željeza kao krajnje prihvatitelje elektrona u respiraciji. Štoviše, bakterije u biofilmovima, koji nastaju površinskim prianjanjem, uživaju u poboljšanoj zaštiti. Ekstracelularne polimerne tvari (EPS) koje izlučuju stanice u biofilmovima štite ih od mehaničkog stresa i smicanja izazvanog protokom tekućine. Biofilmovi također nude otpornost na antibiotike kroz različite mehanizme, poput barijerne funkcije matriksa biofilma, prisutnosti uspavanih perzistentnih stanica i povećane proizvodnje gena specifičnih za otpornost na antibiotike. Uočeno je da bakterije koje nisu povezane s biofilmom, ali su i dalje pričvršćene na površine, mogu pokazivati sličnu otpornost na antibiotike. Osim zaštite od antibiotika, bakterije koje su pričvršćene na površine dobivaju i obranu od predatora. Bakterije u biofilmu ili površinskim mikrokolonijama također se mogu specijalizirati, pri čemu različite vrste stanica zauzimaju specifične regije unutar biofilma. Ovaj postupak je ključan za formiranje bakterijskih spora u nekih vrsta [25].

Površine s karakteristikama koje odgovaraju veličini mikroba mogu zadržati više mikroorganizama nego glađe ili grublje površine. Topografija površine značajno utječe na zadržavanje mikroorganizama, ali je taj fenomen složen. Varijable poput površinskih značajki, parametara stanica (npr. hidrofobnost, filmski slojevi, postupci čišćenja) moraju biti kontrolirane kako bi se u potpunosti razumjelo zadržavanje mikroba. Oblik površinskih značajki igra ključnu ulogu u određivanju broja stanica koje će se zadržati i njihove orijentacije. Kada su površinski žljebovi uski, površina kontakta između stanice i podloge može biti minimalna. Nasuprot tome, širi žljebovi, slične veličine kao mikroorganizmi, povećavaju površinu kontakta između stanice i podloge, čime se povećava energija vezanja i potiče veće zadržavanje mikroorganizama na površini. S druge strane, kod još širih površinskih značajki, gdje je površina kontakta smanjena, stanice se mogu isprati s površine zbog niske interakcije stanica i podloge (slika 9.) [26].



Slika 9. Shematski prikaz topografije površine [26]



Slika 10. Prikaz aspekata interakcije bakterija sa površinom [25]

Slika 10. prikazuje način na koji bakterije prepoznaju površine i vežu se za njih putem različitih mehanizama. U dijelu A prikazana su organeli na površini same bakterije, uključujući pili, curli proteine i bičeve. Ove strukture omogućuju bakterijama kretanje, pričvršćivanje na podloge i međusobnu komunikaciju. Dio B objašnjava interakcije između bakterijskih stanica i podloge. Adhezija ovisi o elektrostatičkim silama i van der Waalsovim interakcijama, dok se pričvršćivanje dodatno stabilizira putem pili, fimbrija i genetskih regulatornih mreža. Topografija površine može utjecati na vezanje bakterija, dok kemijski sastav podloge može promijeniti njihovu sposobnost prianjanja. U dijelu C prikazani su mehanizmi pomoću kojih se bakterije osjete površinu. Promjene pH i osmolarnosti utječu na bakterijsku percepciju površine, dok inhibicija bičeva signalizira bakteriji da je došla u kontakt s čvrstom podlogom, što može potaknuti stvaranje biofilma. Ti mehanizmi ključni su za

razumijevanje bakterijske kolonizacije i otpornosti na različitim materijalima, posebice u medicinskim i industrijskim okruženjima [25].

Površinsko prianjanje također igra ključnu ulogu u adaptivnim ponašanjima poput klizanja, gdje bakterijske zajednice pokazuju koordinirani pokret i rast. Klizanje omogućuje bakterijama da se prilagode okolišnim izazovima i aktivno uhvate hranjive tvari. Nadalje, bakterijska komunikacija putem *quorum sensing-a* poboljšava se površinskim prianjanjem, što omogućava učinkovitu razmjenu informacija i regulaciju fizioloških odgovora [7, 25]. Unatoč tim prednostima, površinsko prianjanje ima i neke nedostatke, osobito inhibiciju pokretljivosti. Međutim, bakterije mogu prevladati ovo ograničenje aktiviranjem fenotipskih promjena koje aktiviraju pokretljivost i sprječavaju trajno prianjanje u određenim kontekstima. Na primjer, klizanje može ponovo aktivirati pokretljivost i pružiti mehanizam za aktivno hvatanje hranjivih tvari. Površinsko prepoznavanje također može pokrenuti ekspresiju virulencijskih faktora kod nekih patogena, pripremajući ih za invaziju domaćina [25].

Bakterije koje slobodno lebde u tekućinama prije nego što se pričvrste na površine, obično nastanjuju jednu od tri regije: 1) u slobodnoj tekućini, gdje stanice ne podliježu učincima površine; 2) u tekućini blizu površine, gdje stanice doživljavaju hidrodinamičke efekte površine; i 3) u blizini površine, gdje stanice doživljavaju kombinirane hidrodinamičke i fizikalno-kemijske učinke, poput van der Waalsovih i elektrostatskih sila. Fizikalno-kemijski učinci koji utječu na prianjanje bakterija na površine detaljno su razrađeni u istraživanjima. Bakterije koje nisu pokretne obično se pričvršćuju na površine pri niskim i umjerenim brzinama fluida, dok pri visokim brzinama fluida nisu u mogućnosti prianjati. Pokretne bakterije se međutimpričvršćuju na površine bez obzira na brzinu fluida. Zanimljivo je da razlika između pokretnih i nepokretnih bakterija nastaje tek kada pokretne stanice aktiviraju svoje bičeve. Bakterije s nefunkcionalnim bičevima ponašaju se slično kao i stanice koje nemaju bičeve [1, 25].

Gustoća suspenzije bakterija u hranjivom mediju obično je između 1,06 i 1,13 g/mL, što omogućava njihovo sporo taloženje na površine iz tekućine. Raspadi bakterija u moru mjere se između 10 i 30 mm/h, dok se gustoća suspenzije E. coli povećava u stacionarnoj fazi, što ubrzava taloženje na površinama. Kada bakterije dođu u kontakt s površinama, prianjanje se odvija u dvije faze. Prvotno prianjanje je reverzibilno, događa se unutar 1 minute i uključuje hidrodinamičke i elektrostatske interakcije. U tom se razdoblju adhezivna sila između bakterija i površine brzo povećava. Ovo je slično promatranju prianjanja polistirenskih kuglica na površinu, a nekoliko studija sugerira da je ovo prvenstveno posljedica fizikalno-kemijskih učinaka, uključujući: gubitak interfacijalne vode, strukturne promjene na molekulama površine i premještanje stanica za maksimalno prianjanje na površinu. Većina bakterija ima neto negativni površinski naboj, osobito tijekom početne stacionarne faze rasta, te se preferencijalno vežu uz površine s pozitivnim nabojem. Ovaj učinak nestaje u medijima visokog ionskog jačanja zbog zaslona naboja. Druga faza prianjanja je nepovratna i traje nekoliko sati, pri čemu dolazi do van der Waalsovih interakcija između hidrofobnih regija vanjskog staničnog zida i površine. Ovaj prijelaz iz reverzibilnog u nepovratno prianjanje također uključuje nekoliko proteina. Nepovratno prianjanje olakšava se proizvodnjom ekstracelularnih polimernih tvari (EPS), koje "učvršćuju" stanice na površini. Jedan od prvih pokazatelja da neke bakterije mogu specifično interagirati s određenim površinama bila su rane promatranja koja su pokazala da različite bakterije koje zauzimaju istu nišu ne interagiraju nužno s istim površinama. Bakterije posjeduju različite vrste ekstracelularnih organela (poput flagela, pili i curli vlakana) koje posreduju specifično prianjanje za površine, pri čemu se ove organele često završavaju proteinima zvanima adhezini, koji se vežu za molekule na površinama domaćina. Dva primjera iz *Escherichia coli* uključuju tip I pili, koji se veže za glikoproteine koji sadrže alfa-D-manozu, te tip IV pili, koji se veže za fosfatidiletanolamin. Reverzibilno prianjanje stanica ne mora nužno dovesti do nepovratnog prianjanja tijekom kolonizacije površine [7, 25].

2.9. Nastanak i svojstva biofilma

Prirodnim formiranjem kolonija bakterija te njihovim prihvaćanjem za površinu dolazi do nastanka biofilma. Više od 90% mikroorganizama se organizira u biofilm te ih nalazimo u jezerima, podzemnim i nadzemnim vodama te na kopnu. Mogu opstati u ekstremnim uvjetima tlaka, temperature i pH te su većinom viševrsne kulture [27].

Biofilm čine mikrobne zajednice ugrađene u jako hidrirane EPS (extracellular polymeric substances) matrice kojeg čine različite organske i anorganske molekule te ima strukture gela. Njegova struktura također utječe o parametrima kao što su kemijski i hidrodinamički uvjeti te koncentraciju hranjive tvari i supstrata u fazi rasta. Ti parametri osiguravaju njihovu raznolikost [1, 25]. Njihov utjecaj na razvoj biofilma nije dovoljno istražen zbog nedovoljno osjetljivih metoda koje bi dale više informacija o biofilmu matrica [27]. Njihove matrice paučinaste je strukture te štite bakterije od imunoloških stanica, lijekova, DNK uništavajućih enzima te nepovoljnih okolišnih uvjeta. Rešetka biofilma sastoji se od DNK vlakana. Vrhovi tvore križ stabiliziran DNABII proteinima koji služe kao spojnica te mogu tvoriti različite poligone koji su međusobno povezani te daju strukturu nalik paučinastoj mreži. Njegova je uloga držati matricu zajedno kako bi stvorio zidove biofilma. Kada ih tvore patogene bakterije, biofilm sprječava liječenje infekcije. Doktori Goodman i Bakaletz te njihov tim znanstvenika došli su do otkrića imunološki urođenog proteina HMGB1, koji djeluje tako da poremeti rad biofilma, čime dolazi do otpuštanja bakterija. On obično ne djeluje upalno no konstruiran sa aminokiselinom koja sadrži jednu amino skupinu, njegovo djelovanje je upalno, dok narušava strukturu filma [18].

Formiranje biofilma na tkivu ima negativan utjecaj u medicini budući da stvaraju jaku rezistenciju prema lijekovima. Biofilm se formira kada se bakterije prihvate za površine materijala, a to mogu biti druge bakterije, biomaterijal ili medicinski

uređaji, putem sekrecije ekstracelularnih polimernih tvari poput proteina, polisaharida, huminskih kiselina i eDNK. Ova struktura doprinosi kroničnim infekcijama i biofoulingu površina u industrijskim uvjetima. Sposobnost mikroorganizama da koloniziraju površine ključna je za formiranje biofilma i njegove patogene efekte. Bakterije u biofilmu otpornije su na antibiotike zbog zaštitnog sloja EPS-a, koji stvara barijere za prodiranje lijekova i inducira dormanciju bakterija. Kao rezultat toga, biofilmovi su teže tretirati i mogu dovesti do ponovnih infekcija. Osim toga, biofilmovi olakšavaju prijenos gena, što može proširiti otpornost na antibiotike. Nedavni interes usmjeren je na korištenje nanomaterijala za ciljanje i narušavanje biofilma, a funkcionalizirani nanomaterijali pokazali su potencijal u učinkovitom dostavljanju antimikrobnih agensa. Međutim, složena struktura i dinamička priroda biofilma, na koje utječu različiti okolišni faktori, otežavaju liječenje. Razumijevanje interakcija nanomaterijala i biofilma ključno je za dizajn učinkovitih antimikrobnih nanomaterijala [7, 28].

Biofilm igra sve važniju ulogu u izazivanju i pogoršavanju ozbiljnih ljudskih bolesti, a broj stanja povezanih s biofilmovima, osobito onih koji su povezani s infekcijama u bolnicama zbog implantata, stalno raste. Biofilmovi su teški za definiranje i uklanjanje jer njihova struktura i sastav mogu značajno varirati od slučaja do slučaja. Unatoč tome, svi mikrobiološki biofilmovi su u osnovi mikroekosustavi, u kojima se mikroorganizmi pridržavaju površina i uranjaju u izvanstaničnu matricu sastavljenu od polimernih tvari mikrobiološkog podrijetla. Osim organskih spojeva mikroorganizama, ova matrica može sadržavati i proteine iz krvi, nekontrolirane komponente poput minerala (kristala) i čestice povezane s korozijom [29].

Mikrobni biofilmovi su zajednice mikroorganizama vezanih za površine u vodenim okruženjima, okružene ekstracelularnim matriksom (EPS) koji se sastoji od polisaharida, proteina, glikoproteina, glikolipida i, ponekad, ekstracelularne DNK. Ovaj matriks utječe na poroznost, gustoću, stabilnost i vodnu ravnotežu biofilma, a također omogućava razmjenu hranjivih tvari s okolnim okruženjem. Oralni biofilmovi, koji sadrže više od 700 mikroorganizama, mogu uzrokovati bolesti poput karijesa, parodontitisa i kandidijaze, a stanice biofilma pokazuju veću otpornost na antimikrobne tretmane u odnosu na planktonske stanice. Biofilmovi su otporniji zbog prisutnosti EPS sloja koji ograničava penetraciju lijekova, te zbog uspavanih stanica koje smanjuju osjetljivost na antibiotike. Fenotipske varijacije, *quorum sensing* i bakterijske pumpe za izbacivanje lijekova dodatno doprinose ovoj otpornosti. Kombinacija više antimikrobnih sredstava i fizičkih tretmana mogla bi biti učinkovitija u borbi protiv biofilmova [6, 28]. Biofilmovi su mikrobne zajednice koje se formiraju na površinama i zaštićeni su izvanstaničnom matricom (EPS) koja se sastoji od polisaharida, proteina, lipida i nukleinskih kiselina. EPS matrica doprinosi stabilnosti biofilma, poroznosti, gustoći i otpornosti na antimikrobne agense. Formiranje biofilma predstavlja veliki problem u medicinskim uređajima (MD) jer patogeni adhezivno prianjaju na površine, što dovodi do infekcija, posebno u invazivnim uređajima poput katetera i implantata. Matrica štiti biofilm od fizičkih, kemijskih i imunoloških napada, što čini infekcije teškim za liječenje. Biofilmovi također pokazuju povećanu otpornost na antibiotike, pri čemu neki pokazuju čak 1000 puta veću otpornost od planktonskih stanica. Struktura biofilma varira ovisno o faktorima poput svojstava podloge, sastava mikroba i uvjeta okoliša, od glatkih filmova do složenih mozaika. Ove strukturne razlike, uključujući pore i kanale, utječu na otpornost i preživljavanje biofilma [1, 2, 6, 7, 25, 28].

2.10. Utjecaj hidrofobnosti na rast i opstanak mikroorganizama

Hidrofobnost pogoduje prianjanju abiotičke i biotičke površine i prodiranju u tkivo domaćina. Prikladna hidrofobna, odnosno hidrofilna svojstva mogu pridonijeti procesima kao razgradnja ugljikovodika ili biorazgradivih poliestera. Hidrofobnost je jedan od bitnih faktora koji utječe na prianjanje mikrobnih stanica za površinu te može povećati njihovu sklonost adheziji. Hidrofobni mikroorganizmi su invazivniji i stvaraju teško liječive bolesti. Povećanje hidrofobnosti povećava adheziju između stanica i agregaciju [8].

U antimikrobnoj zaštiti, hidrofobnost nanomaterijala igra ključnu ulogu u njihovoj interakciji s bakterijama. Hidrofobni nanomaterijali privlače hidrofobne bakterije, što potiče njihovo prianjanje, dok hidrofilne bakterije preferiraju hidrofilne površine. Bakterije također mogu prilagoditi svoju površinsku hidrofobnost kao odgovor na okolišne stresove, što utječe na njihovo vezanje za nanomaterijale. Hidrofobnost nanomaterijala utječe na njihovu biološku aktivnost, budući da se hidrofobni nanomaterijali brzo uklanjaju iz tijela. Međutim, modifikacija njihove površine hidrofiličnom koronom može produljiti njihovu cirkulaciju, iako može smanjiti njihovu sposobnost prianjanja. Balansiranje hidrofobnosti i hidrofiličnosti ključno je za učinkovit sustav dostave antimikrobnih lijekova [7].

Hidrofobne karakteristike mikrobioloških stanica igraju ključnu ulogu u njihovom vezanju za površine, što je bitno za njihov rast i preživljavanje u različitim okruženjima. Hidrofobni mikroorganizmi obično se učinkovitije pridržavaju površina koje su također hidrofobne, dok hidrofili pokazuju sklonost prema hidrofiličnim površinama. Mikroorganizmi imaju sposobnost modificirati svoje površinske osobine, što im omogućuje da prelaze između hidrofobnih i hidrofiličnih stanja kao odgovor na promjene u uvjetima okoliša, poput razina hranjivih tvari i varijacija temperature. Ova fleksibilnost povećava njihove šanse za preživljavanje u raznolikim staništima. U prirodnim ekosustavima, mikroorganizmi obično postoje kao agregati, a ne kao pojedinačne stanice. Njihove hidrofobne osobine su značajne za samoinmobilizaciju, što je ključno za interakciju s organskim materijalima i zagađivačima. Hidrofobna priroda određenih mikrobioloških vrsta također može povećati njihov patogeni potencijal, jer olakšava njihovo vezanje za tkiva domaćina, što dovodi do formiranja biofilma i povećane otpornosti na antimikrobne agense. Razumijevanje kako hidrofobnost utječe na ponašanje mikroorganizama ključno

je za razvoj učinkovitih strategija za upravljanje mikrobnim populacijama, posebno u medicinskim i okolišnim okruženjima gdje je kontrola adhezije i formiranja biofilma od suštinske važnosti [8].

Prilagodbe koje mikroorganizmi razvijaju kao odgovor na hidrofobna okruženja ključne su za njihovo preživljavanje i rast u takvim izazovnim uvjetima. Mikroorganizmi često modificiraju svoje stanične membrane i strukture staničnih zidova kako bi poboljšali svoju sposobnost vezivanja za hidrofobne površine, što je bitno za učinkovito usvajanje hranjivih tvari i interakciju s okolinom. Ove prilagodbe mogu uključivati promjene u fluidnosti membrane, promjene u sastavu proteina i aktivno izbacivanje toksičnih ugljikovodika. Nadalje, nakupljanje hidrofobnih spojeva unutar bakterijskih membrana može poboljšati njihovu dostupnost za biotransformacijske procese, čime se utječe na ukupne metaboličke sposobnosti tih organizama. U sažetku, interakcija između mikroorganizama i hidrofobnih spojeva složen je proces koji utječe na njihov rast i preživljavanje. Razumijevanje ovih interakcija od vitalnog je važnosti za razvoj strategija za poboljšanje bioremedijacijskih napora i povećanje učinkovitosti razgradnje ugljikovodika od strane mikrobioloških zajednica. Različite fiziološke prilagodbe i mehanizmi koje mikroorganizmi koriste za napredovanje u hidrofobnim okruženjima ističu složeni odnos između mikrobiološkog života i njihovih kemijskih okruženja [30].

2.11. Metode istraživanja hidrofobnosti

Napetost površine određuje se mikroskopskim metodama mjerenjem kut kontakta površine i tekućine. Odnos kuta kontakta i međufazne energije dan je Youngovom jednadžbom :

$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cdot \cos\theta_e, \quad (1)$$

gdje γ_{sv} označava čvrstu/ plinovitu fazu, γ_{sl} čvrstu/tekuću fazu, a γ_{lv} tekuću/plinovitu fazu. Kod tekućina gdje je kut kontakta jednak 0 stupnjeva napetost površine jednaka je slobodnoj energiji površine supstrata, što odgovara povećanju hidrofobnosti površine i smanjenju slobodne energije površine [31].

Znanstvenici Fletcher i Marshall dali su teoriju gdje bi se slobodna energija površine bakterija mjerila u prirodnom stanju koristeći metodu kontakta kuta mjehurića ili tekućine (bubble contact angle), povođenjem efekta adsorbirane makromolekule u vodenoj otopini za određivanje kritične napetosti površine. Ti parametri pomažu objasniti bakterijsku adheziju [31].

Hidrofobnost raznih mikroorganizama, uključujući tri vrste bakterija i četiri gljive, procijenjena je korištenjem nekoliko tehnika. Ove metode uključuju mjerenja kontaktnog kuta, kromatografiju hidrofobnih interakcija, analizu fazne distribucije, testove adhezije i testove agregacije soli. Značajna korelacija među ovih pet tehnika zabilježena je za vrlo hidrofobni organizam Moniliella pollinis i izuzetno hidrofiličnu vrstu Saccharomyces cerevisiae i Acetobacter aceti. Međutim, procjena hidrofobnosti za druge mikroorganizme, kao što su Enterobacter aerogenes, Klebsiella oxytoca, Saccharomyces carlsbergensis i Kluyveromyces fragilis, pokazala je varijabilnost ovisno o korištenoj metodi. Komparativna analiza rezultata, zajedno s raspravom o implikacijama uključenih parametara, istaknula je da kontaktni kut vode služi kao značajan pokazatelj hidrofobnosti stanica. Zbog određenih ograničenja povezanih s ovom metodom, preporučuje se kombiniranje s kromatografijom hidrofobnih interakcija i testom adhezije na polistiren kako bi se poboljšala točnost kategorizacije mikroorganizama u hidrofobne, intermedijarne ili hidrofilične skupine [32].

Hidrofobne karakteristike niza mikroorganizama, uključujući tri sojeva bakterija i četiri vrste gljiva, procijenjene su različitim metodologijama. Ove tehnike obuhvaćaju procjene kontaktnog kuta, kromatografiju hidrofobnih interakcija, metode fazne distribucije, testove adhezije i testove agregacije soli. Značajno usklađivanje među ovih pet pristupa pronađeno je za izuzetno hidrofobni organizam *Moniliella pollinis* i vrlo hidrofiličnu vrstu *Saccharomyces cerevisiae* i *Acetobacter aceti*. Nasuprot tome, procjene hidrofobnosti za druge mikroorganizme, kao što su *Enterobacter aerogenes, Klebsiella oxytoca, Saccharomyces carlsbergensis* i *Kluyveromyces fragilis*, pokazale su razlike ovisno o korištenoj metodi. Komparativni pregled nalaza, zajedno s istraživanjem značaja uključenih parametara, naglasio je da je kontaktni kut vode ključna mjera hidrofobnosti stanica. S obzirom na određena ograničenja ove metode, preporučuje se dopuniti je kromatografijom hidrofobnih interakcija i testom adhezije na polistiren kako bi se poboljšala točnost klasifikacije mikroorganizama u hidrofobne, intermedijarne ili hidrofilične kategorije [32].

2.12. Postupci optimiranja temeljeni na dizajnu eksperimenta

Dizajn eksperimenta (DoE) sve se češće koristi kao pristup optimizaciji i razumijevanju kompleksnih sustava u znanosti o materijalima [33]. Ovaj pristup omogućuje istraživačima da istovremeno variraju više nezavisnih parametara, poput koncentracije reagensa, vremena obrade, temperature ili vrste tretmana, i da sistematično istraže njihov utjecaj na hidrofobnost površine. Primjena DoE u modeliranju hidrofobnosti površine pomoću testa kapi predstavlja inovativan i kvantitativan način istraživanja ključnih parametara koji utječu na površinske karakteristike materijala. Time se smanjuje broj potrebnih eksperimenata u usporedbi s klasičnim metodama, dok korištenje regresijskih modela ili metodologije površine odziva (RSM) omogućuje predviđanje hidrofobnih svojstava na temelju odabranih eksperimentalnih uvjeta. Test kapi, čiji se rezultati izražavaju kroz kontaktni kut, postaje pritom mjerilo kvalitete hidrofobne površine, dok DoE olakšava identificiranje optimalnih uvjeta za povećanje kontaktnih kutova, što je ključno za razvoj materijala visokih performansi, poput vodoodbojnih premaza ili samočistećih površina. Dizajn eksperimenta označava niz provedenih eksperimenata čiji cilj je izrada nekog modela te prilikom određivanja uvjeta potrebnih za razvoj produkta ili dobivanje određenih procesnih karakteristika [9]. Odabir vrste eksperimenta igra bitnu ulogu na kvalitetu samog dizajna. Varijablu koju kontrolirano mijenjamo nazivamo

faktor, a u praksi se najčešće koristi viševarijantni pristup (slijedna, istodobna i mješovita optimizacijska strategija). Odziv smatramo varijablom koja opisuje izvođenje dizajna eksperimenta, a označavaju karakteristike nekog procesa ili produkta koje želimo optimirati. Dizajn eksperimenta započinje određivanjem faktora koji i u kojoj mjeri utječu na odzive, a mogu biti kvalitativni i kvantitativni. Zatim pronalazimo model koji kvantitativno opisuje taj utjecaj. Završno definiramo optimalne vrijednosti faktora koje daju najviši ili najniži odziv. Optimalne vrijednosti su one vrijednosti koje najbolje karakteriziraju produkt ili sam proces. Ključne komponente DOE-a uključuju jasno definiranje istraživačkih ciljeva, razumijevanje uključenih faktora, određivanje veličine uzorka i izvođenje eksperimenata u fazama [34].

Dodatno, uključuje metode poput blokiranja, randomizacije i zaslijepljivanja kako bi se kontrolirala varijabilnost i smanjile pristranosti istraživača. U svakom eksperimentu, dizajnerski faktori izravno utječu na rezultate, dok ometajući faktori, koji nisu u potpunosti pod kontrolom, mogu neizravno utjecati na izlaz [35]. Metoda odzivnih površina obuhvaća matematičke i statističke tehnike koje se koriste za modeliranje i analizu problema u kojima odgovor ovisi o nekoliko varijabli, a cilj je optimizirati taj odgovor [36]. Ona uključuje dizajniranje eksperimenata, razvoj matematičkog modela i određivanje optimalne vrijednosti odgovora kako bi se bolje razumjelo ponašanje sustava. Empirijski odnosi često se uspostavljaju pomoću polinomskih modela, a za prikupljanje podataka koriste se eksperimenti prvog i drugog reda. Polinomni model prvog reda može se izraziti sljedećom jednadžbom:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_j x_j + \varepsilon \quad (2)$$

gdje y predstavlja odgovor, $\beta_0, \beta_1, \ldots, \beta_k$ su nepoznati regresijski koeficijenti, x_1, x_2,..., x_k su ulazne varijable, k je broj ulaznih faktora, a ε predstavlja slučajnu pogrešku [36].

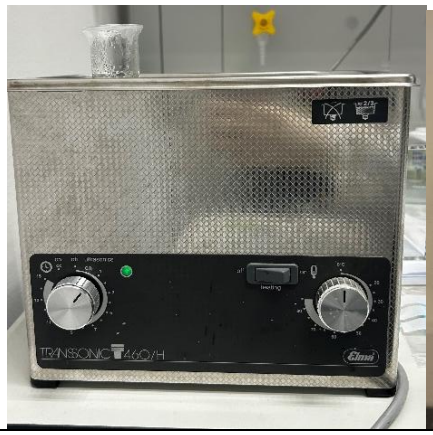
Pažljivim strukturiranjem eksperimenata, DOE omogućava dublje uvide i bolje razumijevanje procesa, osiguravajući pouzdane i ponovljive rezultate. Osim toga, temeljita statistička analiza nakon eksperimenta ključna je za pravilnu interpretaciju podataka i izbjegavanje uobičajenih pogrešaka, čime se osiguravaju valjani zaključci [34, 37, 38, 39].

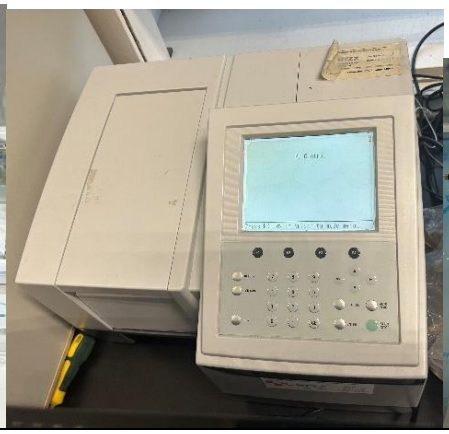
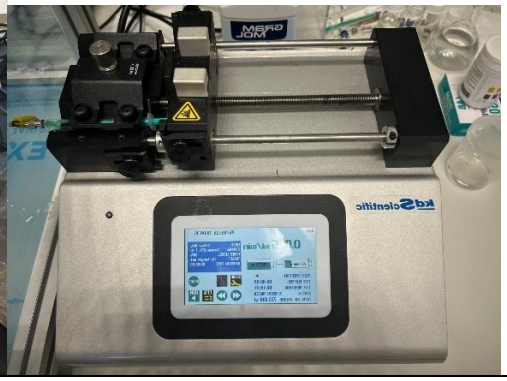
Unatoč svojim prednostima, DoE ima i svoja ograničenja. Kompleksnost pravilnog osmišljavanja eksperimentalnog dizajna zahtijeva visoku razinu stručnosti, dok test kapi, iako široko prihvaćen, može biti osjetljiv na vanjske faktore poput temperature, vlage i tehničke izvedbe, što može dodati varijabilnost podacima. Dobiveni matematički modeli često su specifični za odabrane materijale i uvjete, a statički kontaktni kut, kao najčešće korištena mjera, zanemaruje dinamičke aspekte hidrofobnosti poput kuta napredovanja i povlačenja. Ipak, DoE u modeliranju hidrofobnosti ima široku primjenu, posebno u industriji i znanosti, a njegova daljnja primjena može se unaprijediti integracijom naprednih tehnika karakterizacije poput skenirajuće elektronske mikroskopije i spektroskopije, analizom robusnosti modela i uključivanjem ekoloških i ekonomskih čimbenika u optimizaciju procesa. Unatoč izazovima, DoE predstavlja moćan alat za razumijevanje i optimizaciju hidrofobnih svojstava materijala, dok njegova primjena u kombinaciji s komplementarnim tehnikama pruža značajan potencijal za napredak u znanosti o materijalima [33].

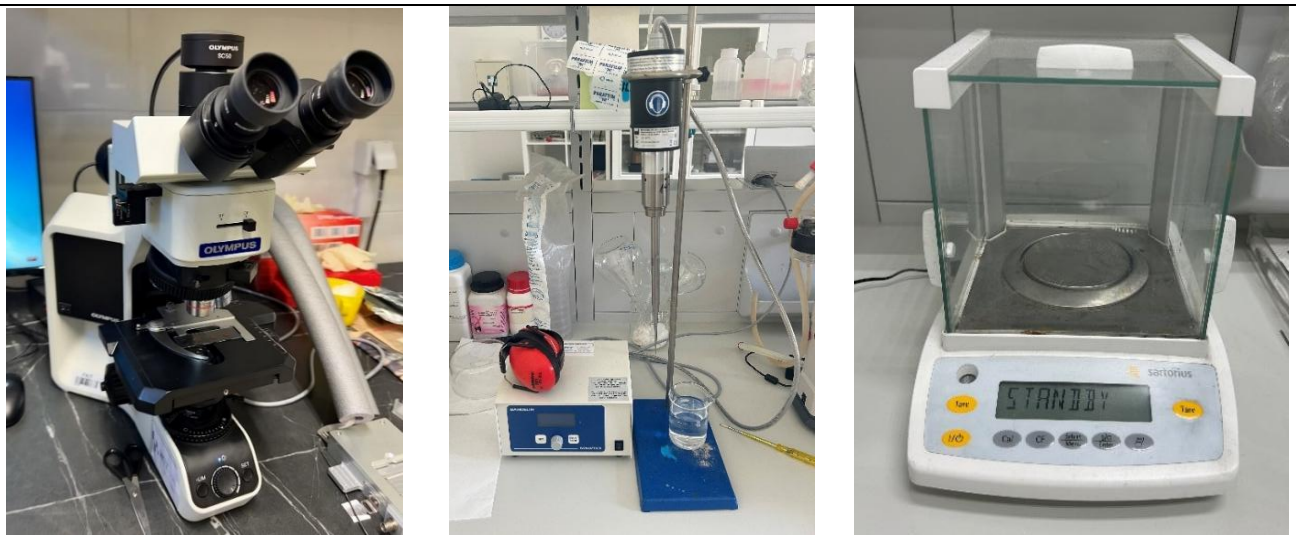
2. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Prilikom provođenja istraživanja korištene su sljedeće navedene tvari:





Slika 11. Slika aparature potrebne za provedbu eksperimenta

Prilikom ispitivanja hidrofobnosti korišten je detergent „Čarli sensitive“ proizvođača Meteor Grupa-Labud d.o.o. i nanovlakna polikaprolaktona (PCL) dobivena elektroispredanjem.

Kemijska reakcija prikazana je slikom 12. L-askorbinska kiselina (vitamin C) poznata je po svojoj sposobnosti djelovanja kao snažno redukcijsko sredstvo. U prisutnosti prijelaznih metalnih iona, poput bakrovih iona (Cu^{2+}), askorbinska kiselina sudjeluje u redoks reakcijama pri čemu se sama oksidira, a metalni ioni se reduciraju.

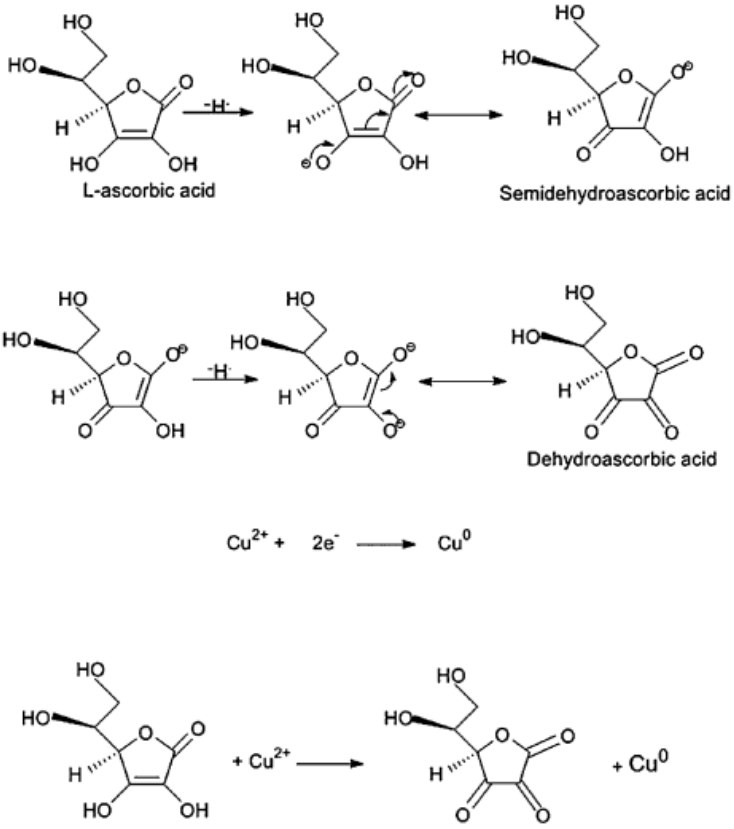
Proces oksidacije L-askorbinske kiseline odvija se u dvije faze. U prvoj fazi, askorbinska kiselina gubi jedan atom vodika (proton i elektron), pri čemu nastaje semidehidroaskorbinska kiselina, radikalni međuprodukt. Ovaj oblik je relativno nestabilan i reverzibilan. U drugoj fazi oksidacije dolazi do gubitka još jednog atoma vodika, čime se semidehidroaskorbinska kiselina oksidira u dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA), koja predstavlja stabilniji oksidirani oblik.

Paralelno s oksidacijom askorbinske kiseline, dolazi do redukcije iona bakra. Bakar(II) ioni (Cu^{2+}) primaju dva elektrona te se reduciraju u elementarni bakar (Cu^0). Ova reakcija prikazuje klasičan redoks mehanizam u kojem vitamin C donira elektrone metalnim ionima.

Ukupna kemijska jednadžba redoks reakcije može se prikazati na sljedeći način:

$$C_6H_8O_6 + Cu^{2+} \rightarrow C_6H_6O_6 + Cu^0 + 2H^+$$

Ova reakcija ima široku primjenu u području sinteze metalnih nanočestica, jer omogućuje ekološki prihvatljivu (tzv. „zelenu“) redukciju metala bez potrebe za dodatnim kemijskim redukcijskim sredstvima [40].



Slika 12. Reakcija redukcije nanočestica bakra [40]

3.2. Metode priprema nanočestica

3.2.1. Metoda pripreme otopine bez upotrebe stabilizatora

Eksperiment započinje pripremom otopina modre galice koncentracije1 M, L-(+)- askorbinske kiseline koncentracije 1,2 M i natrijeva karbonata koncentracije 2 M. Tako pripremljene otopine se zatim filtriraju preko filera i šprice te se sve otopine zajedno pomiješaju redoslijedom kojim su navedene. Priređena otopina stavi se grijati na magnetsku miješalicu sat vremena pri konstantnoj temperaturi od 80°C. Nakon završetka reakcije otopina se ostavi preko noći. Sljedeći dan se filtrira preko Büchnerova lijevka i dobiveni filtrat sačuva.

3.2.2. Metoda pripreme otopine sa stabilizatorom

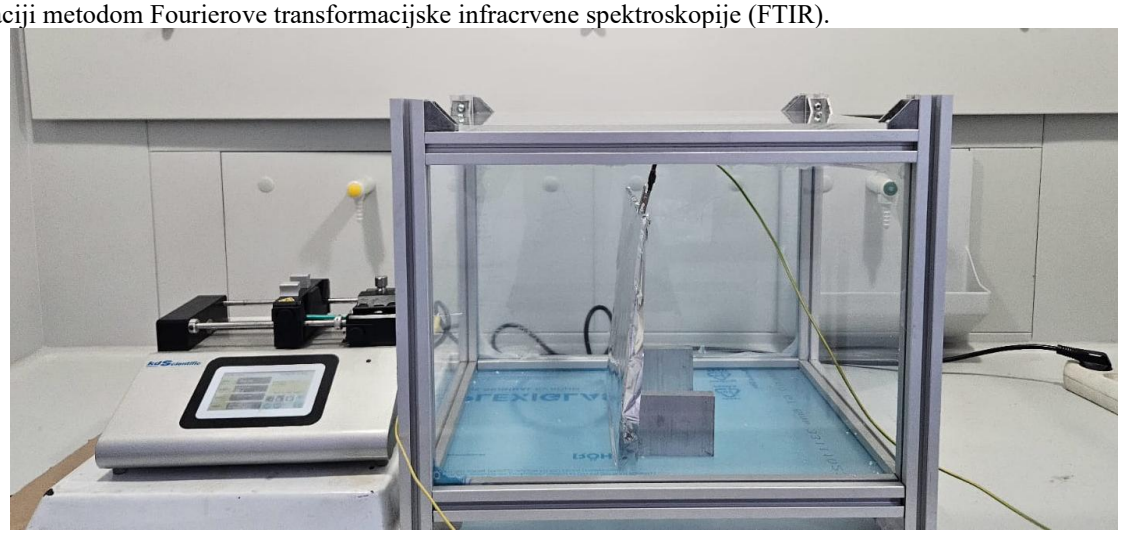
Pripreme se otopine modre galice koncentracije 0,5 M, L(+)- askorbinske kiseline koncentracije 0,6 M, natrijeva karbonata koncentracije, 1 M i 0,0042 M stabilizatora PVP-a. Tako pripremljene otopine se zatim filtriraju preko filtra i šprice i sve se otopine pomiješaju navedenim redoslijedom. Otopina se zatim stavi grijati na magnetsku miješalicu jedan sat na konstantnu temperaturu od 80°C te nakon isteka vremena ostavi preko noći. Sljedeći dan otopina se filtrira preko Büchnerovog lijevka.

Na isti način sintetizirana je otopina upotrebom NaOH umjesto Na_2CO_3. Pritom je korišteno 2,78 M NaOH.

3.3. Metoda elektroispredanja

Provedeno je elektroispredanje PCL nanovlakana iz smjese otapala dimetilformamida i diklormetana u omjeru 1:4 i elektroispredanje PCL nanovlakana iz iste smjese otapala s otopinom nanočestica bakra. Elektroispredanje je metoda kojom se pomoću elektrostatskog potencijala pri velikoj voltaži i slaboj struji stvaraju ultrafina vlakna. Za sam proces elektroispredanja potrebna je otopina polimera ili otopljeni polimer, koji se zatim unosi u iglu štrcaljku te pod određenim pritiskom na iglu i pri velikom naponu polimer izlazi na kolektor u obliku vlakna. Kapi polimera, koje su zbog napetosti površine sfernog oblika, se pod utjecajem velikog napona, pri čemu dolazi do kretanja naboja, rastežu i mijenjaju prvobitan oblik u oblik Taylorovog stožca. Dobro namještanje parametara sila odgovornih za stvaranje Taylorovog stožca upravljanjem brzinom protoka, udaljenosti igle od mete, promjerom igle i naponom pogoduju stvaranju stabilnog mlaza. Kako se električki nabijeni mlaz kreće, dolazi do isparavanja otapala i stvaranja vlakana. Depozicija vlakana se odvija na metalnom kolektoru, najčešće aluminijskoj foliji, smještenoj na određenoj udaljenosti od vrha same šprice [41].

Pripremljeni uzorak apliciran je u štrcaljku opremljenu iglom promjera 21G te postavljen na udaljenost od 10 cm od metalne ploče. Štrcaljka je spojena na izvor visokog napona, a elektroispredanje je provedeno pri naponu od 17 kV i protoku od 0,017 mL/min. Spajanje aparature prikazano je slikom 13. Po završetku procesa elektroispredanja, dobiveni materijal ostavljen je na sušenje pri sobnim uvjetima. Nakon sušenja, uzorci su podvrgnuti analizi optičkim mikroskopijom te karakterizaciji metodom Fourierove transformacijske infracrvene spektroskopije (FTIR).



Slika 13. Aparatura potrebna za elektroispredanje

3.4. Metode istraživanja svojstava površina nanovlakana PCL-a

Prethodno je potrebno pripremiti otopine različitog volumnog udjela vode, detergenta i nanočestica bakra (Tablica 6.). Otopine se zatim nanose kao kapi volumena 4 μL na hidrofobnu površinu nanovlakna. Pritom je potrebno zabilježiti vrijeme potrebno kako bi materijal apsorbirao kapljicu u potpunosti.

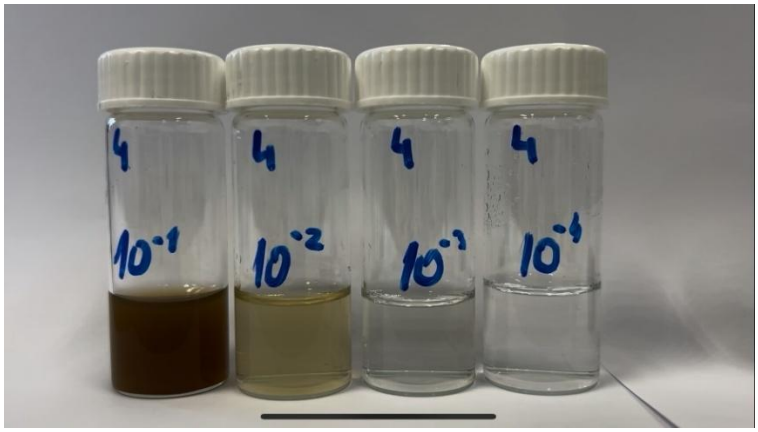
Tablica 6. Eksperimenti provedeni za određivanje hidrofobnosti površine.

Broj eksperimenta	H_2O, vol %	Derergent 2 g/L, vol %	CuNP, vol %
1	47.50	47.50	5.00
2	100.00	0.00	0.00
3	24.38	71.88	3.75
4	0.00	97.50	2.50
5	95.00	0.00	5.00
6	50.00	50.00	0.00
7	0.00	95.00	5.00
8	65.00	33.33	1.67
9	71.88	24.38	3.75
10	65.00	33.33	1.67
11	0.00	100.00	0.00
12	0.00	97.50	2.50
13	33.33	65.00	1.67
14	71.88	24.38	3.75
15	100.00	0.00	0.00
16	50.00	50.00	0.00
17	16.00	80.00	4.00
18	47.00	50.00	3.00
19	68.00	30.00	2.00
20	99.00	0.00	1.00

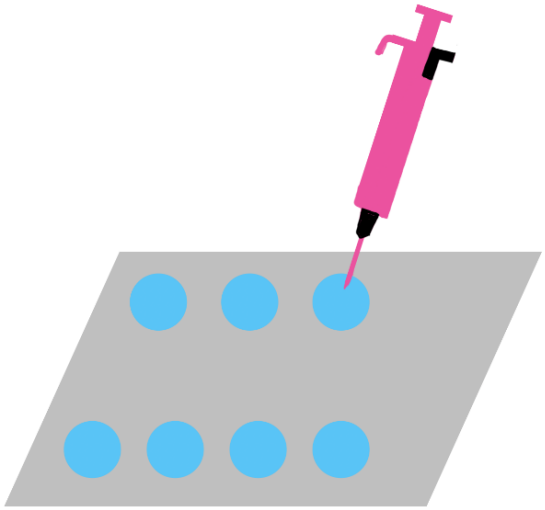
3.5. Metoda nanošenja kapi na stakalce

Početni dobiveni filtrat stavi se miješati na ultrazvučnu miješalicu 5 minuta. Filtrat se koristi za pripremu četiri razrjeđenja (slika 14.) od čega se odaberu ona koja nisu u potpunosti prozirna i nemaju vidljiv talog, iz kojih se automatskom pipetom uzima uzorak 0,5 μL i kontrolirano ispušta na prethodno očišćeno predmetno stakalce. Prilikom ispuštanja kapi vodi se računa

da je razmak između samih kapi i od ruba dovoljno velik kako kapi ne bi migrirale. Na predmetno stakalce pažljivo je ispušteno 20 kapi te je postupak ponovljen za sva četiri razrjeđenja otopina nanočestica bakra. Stakalca se postavljaju u zatvorenu komoru kako bi se sušenjem, odnosno isparavanjem otapala dobio *coffee ring* efekt (slika 15.). Osušena predmetna stakalca promatraju se pod mikroskopom.



Slika 14. Priređena razrjeđenja filtrata otopine sa stabilizatorom.



Slika 15. Metoda nanošenja kapi na predmetno stakalce

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati postupaka priprave nanočestica bakra

Postupak priprave nanočestica bakra uz dodatak stabilizatora, u ovom slučaju polivinilpirolidona (PVP), ne razlikuje se značajno od sinteze bez stabilizatora. Međutim, razlike u svojstvima dobivenih otopina postaju uočljive već u ranoj fazi sinteze.

Prva primjetna razlika odnosi se na izgled i viskoznost otopine. Otopina pripremljena bez PVP-a je svjetlije boje i manje viskozna u usporedbi s onom koja sadrži stabilizator. Nadalje, kod otopine bez PVP-a dolazi do brzog taloženja čestica – već nakon jedne minute mirovanja uočava se stvaranje vidljivog taloga. Suprotno tome, PVP privremeno stabilizira nanočestice u otopini, sprječavajući njihovu brzu agregaciju i taloženje (slika 16.).

Obje otopine imaju pH vrijednost u rasponu između 10 i 12. Tijekom zagrijavanja uz miješanje, dolazi do promjene boje – otopine postupno prelaze u tamno smeđu nijansu. Otopina bez PVP-a pritom poprima izraženiju bakreno-smeđu boju, dok je kod otopine sa stabilizatorom nijansa tamnija i homogenija.

Nakon što se sustavi ohlade preko noći, u zatvorenoj posudi dolazi do daljnje promjene: kod uzorka bez PVP-a jasno je vidljiv bakreni talog na stijenkama posude, dok je kod uzorka sa stabilizatorom takav talog teško uočljiv zbog intenzivne boje otopine (slika 17.).

Završna razlika očituje se nakon filtracije pomoću Büchnerovog lijevka. Filter papir korišten za otopinu bez stabilizatora poprima karakterističnu bakreno-smeđu boju, dok je papir iz uzorka sa PVP-om tamnosmeđ, što ukazuje na razliku u sastavu i količini izdvojenih čestica. Sami filtrat slične je, tamno smeđe boje što ukazuje na prisutnost nanočestica bakra.

4.2. Rezultati karakterizacije nanočestica bakra

Karakterizacija nanočestica odnosi se na njihovu veličinu, oblik, kvantitetu, naboj, strukturu površine, tip receptorske stanice i vrijeme inkubacije [19].

4.2.1. UV/Vis spektroskopska analiza uzoraka

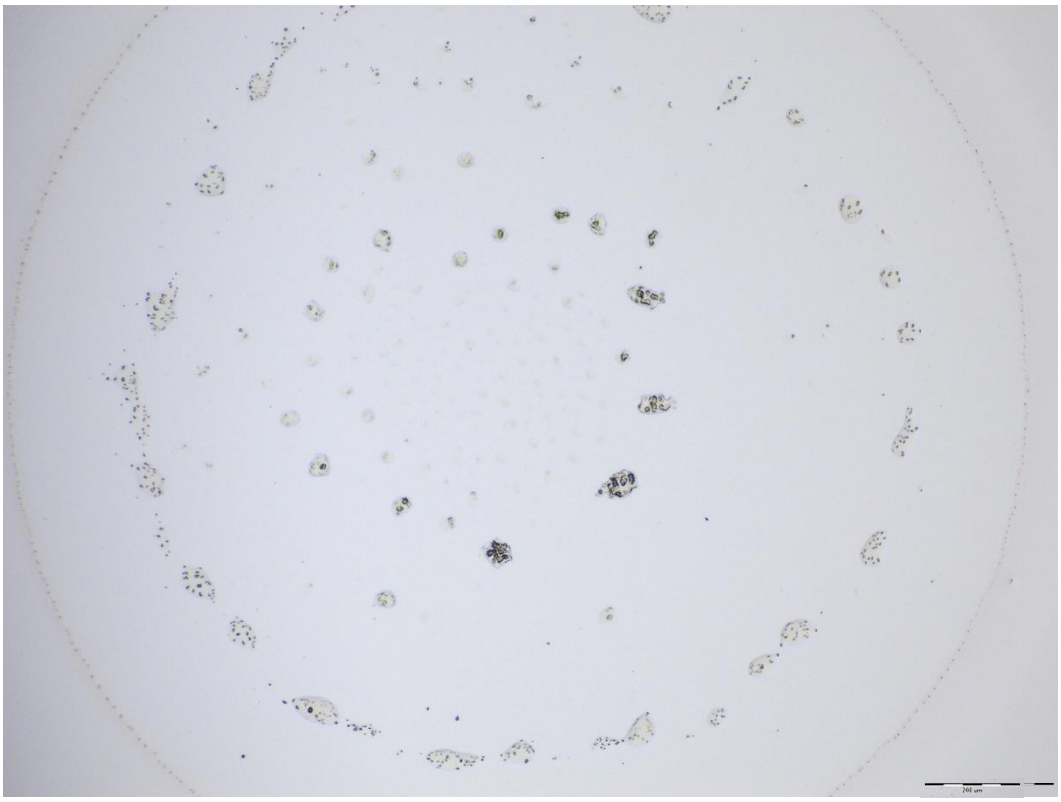
UV/Vis spektroskopija jedna je od ključnih metoda za potvrdu prisutnosti i procjenu svojstava metalnih nanočestica u otopini. U slučaju bakrovih nanočestica, karakterističan apsorpcijski pik koji potječe od kolektivne oscilacije slobodnih elektrona (lokalizirani površinski plazmonski rezonantni pik, LSPR) obično se javlja u području između 550 i 600 nm, a najčešće je centriran oko 570 nm [43]. Pozicija i oblik tog pika mogu značajno varirati ovisno o veličini, obliku, raspodjeli i agregatnom stanju nanočestica, kao i o sastavu otapala i prisutnosti stabilizatora.

Spektar pokazuje blagi pad apsorbancije između 530–550 nm. Razlog tome može biti da se nalazimo u lužatom području te premala koncentracija samog bakra [44]. Prisutnost stabilizatora može usporiti rast i aglomeraciju čestica, no istovremeno može prigušiti plazmonski signal, čineći identifikaciju nanočestica bakra putem UV/Vis metode nesigurnom [45]. Međutim, prisutan je široki apsorpcijski pik oko 540 nm, što je u skladu s literaturnim podacima za vrlo male, stabilne nanočestice bakra, prosječne veličine manje od 4 nm [3, 46].

Povećanje intenziteta apsorbancije može biti posljedica rasta broja nanočestica koje nastaju tijekom redukcije bakrovih iona [47]. Ovi nalazi sugeriraju da viša koncentracija L-askorbinske kiseline poboljšava njezinu zaštitnu ulogu, što rezultira formiranjem manjih bakrovih nanočestica [3].

4.2.2. Coffee ring efekt

Coffee ring kapi razrijeđenih otopina promatra se pod mikroskopom. Za pripremu *coffee ringa* odabrana je otopina s Na_2CO_3 i stabilizatorom.



Slika *16*. Coffee ring uzorka dobivenog sintezom sa Na_2CO_3 i stabilizatorom pri ukupnom povećanju od 50x snimljen na optičkom mikroskopu.

Na slici 22. prikazana je mikrofotografija *coffee ring* efekta nastalog priređivanjem razrjeđenja otopine 2 pri ukupnom povećanju mikroskopa od 500x. *Coffee ring* se uspješno formirao, pri čemu je gustoća čestica na rubu najveća što potvrđuje da je kapilarni tok tijekom isparavanja nosio nanočestice prema rubu [49, 50]. Nešto više čestica ostalo je u blizini centra kapljice, pri čemu je došlo do aglomeracije. Razlog tome može biti pre sporo sušenje i koagulacija tijekom sušenja.

Stabilnost priređenih sustava

Kako bismo utjecali na stabilnost otopina dodali smo lužinu natrijeva karbonata koja prisutna u malim količinama nije toksična [55]. Natrijev karbonat zamjenjuje natrijev hidroksid, već unaprijed poznat, izuzetno toksičan reagens potreban za priređivanje nanočestica. Polivinilpirolidon koristi se kao stabilizator. Prije miješanja otopine bez PVP-a uočeno je da dolazi do taloženja smjese, do čega kod sustava sa PVP-om ne dolazi radi stabilizacijskog efekta reagensa. Nakon hlađenja otopina preko noći uočena je mala količina taloga prisutna kod oba uzorka. Stabilnost priređenih sustava dodatno je potvrđena metodom UV/Vis spektrometrije.

4.3. Rezultati određivanja hidrofobnosti površina

4.4.1. Površinska svojstva PCL nanovlakana

Najprije je potrebno pripremiti ispitivanu površinu. Izabrani materijal su nanovlakna PCL-a dobivena metodom elektroispredanja. Hidrofobnost površine određivana je nanošenjem kapi otopina volumena 4 μL. Otopine je potrebno prethodno prirediti miješanjem određenog volumena otopine nanočestica bakra, otopine detergenta i vode. Tablica 7. prikazuje omjere potrebne za pripremu otopine čiji se volumen kapi od 4 μL automatskom pipetom nanosi na hidrofobni materijal dobiven elektroispredanjem nanovlakana, pri čemu se mjeri vrijeme potrebno za apsorpciju te otopine na površini nanovlakana. Hidrofobnost je testirana AATCC test method 79-2000 metodom.

Tablica 7. Rezultati testa određivanja hidrofobnosti površine nanovlakana bez nanočestica bakra

Broj eksperimenta	H_2O, vol %	Derergent 2 g/L, vol %	CuNP, vol %	Vrijeme upijanja 4 μL kapi, s
1	47.50	47.50	5.00	743.00
2	100.00	0.00	0.00	2633.00
3	24.38	71.88	3.75	311.00
4	0.00	97.50	2.50	245.00
5	95.00	0.00	5.00	3245.00
6	50.00	50.00	0.00	634.00
7	0.00	95.00	5.00	157.00
8	65.00	33.33	1.67	916.00
9	71.88	24.38	3.75	1032.00
10	65.00	33.33	1.67	781.00
11	0.00	100.00	0.00	156.00
12	0.00	97.50	2.50	214.00
13	33.33	65.00	1.67	781.00
14	71.88	24.38	3.75	1384.00
15	100.00	0.00	0.00	2699.00
16	50.00	50.00	0.00	590.00
17	16.00	80.00	4.00	181.00
18	47.00	50.00	3.00	830.00
19	68.00	30.00	2.00	1318.00
20	99.00	0.00	1.00	1778.00



Slika *17*. Ispitivanje hidrofobnosti nanovlakana bez nanočestica bakra

Također je proveden pokus kako broj slojeva nanovlakana utječe na vrijeme upijanja otopine što je prikazanao Tablicom 8.

Tablica 8. Utjecaj broja slojeva na vrijeme upijanja kapljice vode volumena 4 μL

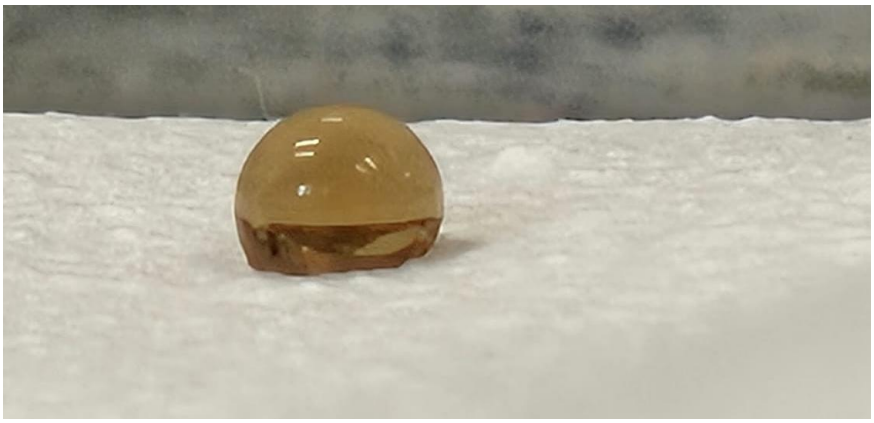
Broj slojeva	Vrijeme upijanja, s
1	2589
2	2917

.4.2. Površinska svojstva PCL nanovlakana obogaćena bakrenim nanočesticama

Priređene su nanovlakna PCL-a dobivena metodom elektroispredanja pri čemu su u otopinu za elektroispredane dodane nanočestice bakra. Metodologija određivanja hidrofobnosti površine jednaka je onoj primijenjenoj pri analizi nanovlakana PCL-a bez dodatka nanočestica bakra. Kako bi se provelo optimiranje hidrofobnosti površine, uporabom programa State Ease, isplanirano je 20 preliminarnih eksperimenata (16 točaka za postaviti model te 4 točke za njegovu provjeru) koji su bili osnova za dobivanje modela koji opisuje hidrofobnost površine elektroispredenog materijala. Rezultati preliminarnih testova prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati testa određivanja hidrofobnosti površine koja sadrži nanočestice bakra.

Broj eksperimenta	H_2O, vol %	Detergent 2 g/L, vol %	CuNP, vol %	Vrijeme upijanja 4 μL kapi, s
1	47.50	47.50	5.00	1.00
2	100.00	0.00	0.00	58.00
3	24.38	71.88	3.75	8.05
4	0.00	97.50	2.50	5.40
5	95.00	0.00	5.00	6.16
6	50.00	50.00	0.00	22.29
7	0.00	95.00	5.00	5.46
8	65.00	33.33	1.67	33.07
9	71.88	24.38	3.75	940.00
10	65.00	33.33	1.67	73.00
11	0.00	100.00	0.00	9.60
12	0.00	97.50	2.50	2.80
13	33.33	65.00	1.67	10.22
14	71.88	24.38	3.75	460.00
15	100.00	0.00	0.00	1072.00
16	50.00	50.00	0.00	12.75
17	16.00	80.00	4.00	20.00
18	47.00	50.00	3.00	10.75
19	68.00	30.00	2.00	545.00
20	99.00	0.00	1.00	1140



Slika *18*. Ispitivanje hidrofobnosti nanovlakana sa nanočesticama bakra.

4.5. Osvrt na provedene postupke optimiranja

4.5.1. Rezultati dobiveni sintezom bez nanočestica bakra

Koraci postupka optimiranja:

1. Postavimo eksperiment pomoću Design Expert State ease programa, on nam ponudi 16 točaka koje moramo provesti kako bi ispitali sustav od 3 komponente u smjesi
2. Provedemo testove, zabilježimo rezultate
3. Dobivene rezultate unesemo u program i unutar programa provedemo modeliranje
4. Dobiveni rezultat je prikazan Slikom 27.

Dobivanje modela:

1. Modeliranje:

Tablica 10. Tablica koeficijenata i standarada

Komponente	Procjena koeficijenta	Standardna pogreška
A-H2O	2666.39	73.33
B-Detergent 2g/L	157.65	103.19
C-CuNPs, %	-1.050E+005	1.572E+005
AB	-3181.59	387.03
AC	1.255E+005	1.655E+005
BC	1.107E+005	1.654E+005
A^2BC	-2.365E+005	56917.79
AB^2C	-55492.80	53347.05
ABC^2	2.324E+006	9.601E+005

Model ovisi o mnogim parametrima (A,B, i C su voda, detergent i nanočestice bakra) te njihovim međusobnim interkacijama.

Tablica 11. Jednadžbe komponenata

Konačna jednadžba izražena pomoću L pseudo-komponenti:	
Vrijeme hidrofobnosti 4 microL	=
+2666.39	* A (H_2O)
+157.65	* B (Detergent)
-1.050E+005	* C (CuNP)
-3181.59	* AB
+1.255E+005	* AC
+1.107E+005	* BC
-2.365E+005	* A^2BC
-55492.80	* AB^2C
+2.324E+006	* ABC^2

Tablica 12. Tablica rezultata optimizacije hidrofobnosti

Odgovor	A	B	C	AB	AC	BC	A^2BC	AB^2C	ABC^2
Vrijeme hidrofobnosti 4 microL	2666.39	157.655	-105041	-3181.59	125482	110719	-236471	-55492.8	2.3239E+006
p=	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.4731	0.5247	0.0043	0.3328	0.0461

Legenda: p <0.01 ; 0.01<= p <0.05 ; 0.05<= p <0.10 ; p >= 0.10

2. Određivanje minimalne i maksimalne hidrofobnosti na temelju dobivenog modela:

Čista voda ima maksimalnu hidrofobnost, dok detergent i nanočestice smanjuju znatno dobivene rezultate.

3. Određivanje opimuma minimalne hidrofobnosti:

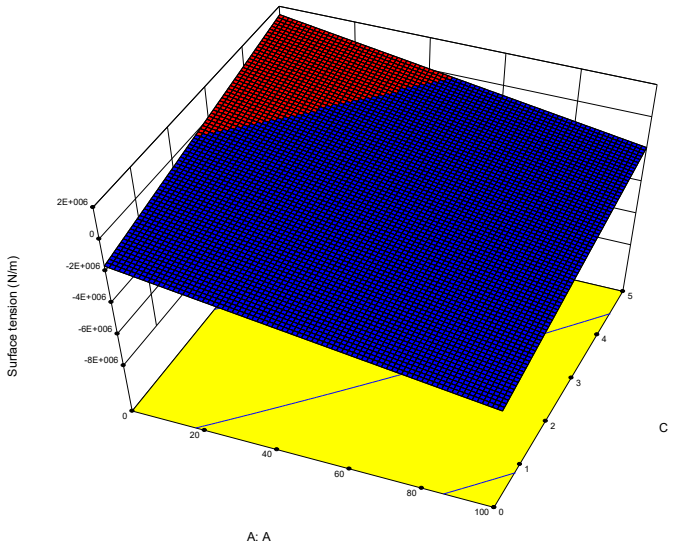
4. Predviđanje željene hidrofobnosti u odabranim točkama koje nisu točke korištene za modeliranje sustava:

Tablica 13. Usporedba rezutata radi provjere točnosti modela

Broj eksperimenta	H_2O, vol %	Detergent 2g/L, vol%	CuNP, vol %	EKSPERIMENT Vrijeme upijanja 4 µL kapi, s	RAČUNSKI Vrijeme upijanja 4 µL kapi, s	POGREŠKA (A-B)/A
17	16	80	4	181	150	0.17
18	47	50	3	830	344	0.58
19	68	30	2	1318	947	0.28
20	99	0	1	1778	2831	-0.59

* pogreška u rasponu od 17 do 50 posto govori da model u nekim točkama bolje, a u nekima lošije opisuje sustav

Osim modeliranja, u programu State Ease moguće je pratiti i međusobne interakcije pojedinih parametara, pa je na slijedećoj slici prikazan određena ovisnost hidrofobnosti (površinske napetosti) o promjeni koncentracija reagenasa- količine nanočestica (parametra C) i tenzida (parametra A).



Slika 19. Odnos površinske napetosti i promjene količina nanočestica (C) i tenzida (A)

4.5.2. Rezultati dobiveni sintezom sa nanočesticama bakra

Tablica 14. Sastav otopina koje sadrže nanočestice bakra i izmjerena hidrofobnost

Otopine				
Broj	H2O	Detergent 2g/L	CuNPs, %	Napetost površine
1	74.182	22.381	3.438	1376.127

2	71.719	25.208	3.073	1197.184
3	79.157	17.573	3.270	2601.819
4	81.208	16.670	2.122	1493.562
5	82.936	14.712	2.353	2509.029

OPTIMIZACIJA ZA MINIMALNU POVRŠINSKU NAPETOST

Tablica 15. Optimizacija sastava otopina koje sadrže nanočestice bakra i izmjerene hidrofobnosti

Otopine				
Broj	H2O	Detergent 2g/L	CuNPs, %	Napetost površine
1	36.610	58.390	5.000	1.422
2	38.489	56.511	5.000	1.427
3	42.547	52.453	5.000	1.470
4	45.335	49.665	5.000	1.527
5	47.244	47.756	5.000	1.579

1. POINT PREDICTION – PREDVIĐANJE U TOČKAMA

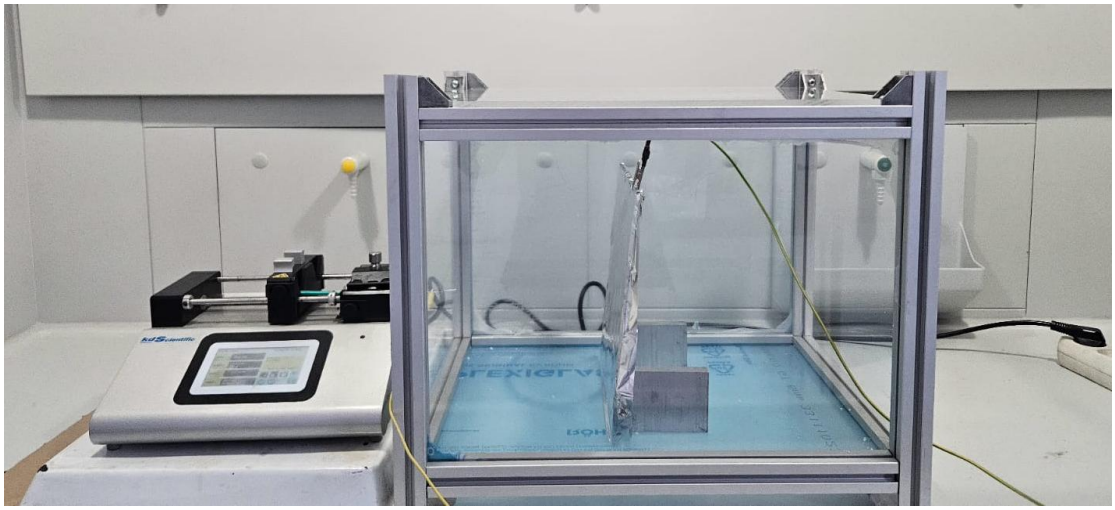
Tablica 16. Preciznost modela za svaku otopinu

Broj eksperimenta	H_2O, vol %	Detergent 2g/L, vol%	CuNP, vol %	EKSPERIMENT Vrijeme upijanja 4 µL kapi, s	PREDVIĐENO Vrijeme upijanja 4 µL kapi, s	RAZLIKA, %
17	16	80	4	20	21.2701	5,9
18	47	50	3	10.75	96.915	88.9
19	68	30	2	545	280.193	94,5
20	99	0	1	1140	1253.35	9,0

U rubnim točkama model nije precizan, no u središnjim odlično opisuje eksperiment, sa samo 5,9 do 9% pogreške.

4.6. Priprema nanovlakana PCL-a s nanočesticama bakra metodom elektroispredanja

Za izradu nanovlakana potreban je 1 g PCL-a otopljenog pri sobnoj temperaturi u DCM-a i DMF-a. Isti omjer je korišten i za pripremu nanovlakana sa nanočesticama bakra prilikom čega je dodano 160 µL uzorka nanočestica bakra sintetiziranog korištenjem Na_2CO_3 i stabilizatora (uzorak 2). Pripremljeni uzorak apliciran je u štrcaljku opremljenu iglom promjera 21G te postavljen na udaljenost od 10 cm od metalne ploče. Štrcaljka je spojena na izvor visokog napona, a elektroispredanje je provedeno pri naponu od 17 kV i protoku od 0,017 mL/min. Spajanje aparature prikazano je slikom 32. Po završetku procesa elektroispredanja, dobiveni materijal ostavljen je na sušenje pri sobnim uvjetima. Nakon sušenja, uzorci su podvrgnuti analizi optičkim mikroskopom te karakterizaciji metodom Fourierove transformacijske infracrvene spektroskopije (FTIR).



Slika *20*. Aparatura potrebna za elektroispredanje

4.7. Usporedba materijala dobivenih elektroispredanjem

Nakon završenog procesa elektroispredanja oba materijala, golim okom nije uočljiva značajna razlika u materijalu što je vidljivo usporedbama slike 32. i slike 33.

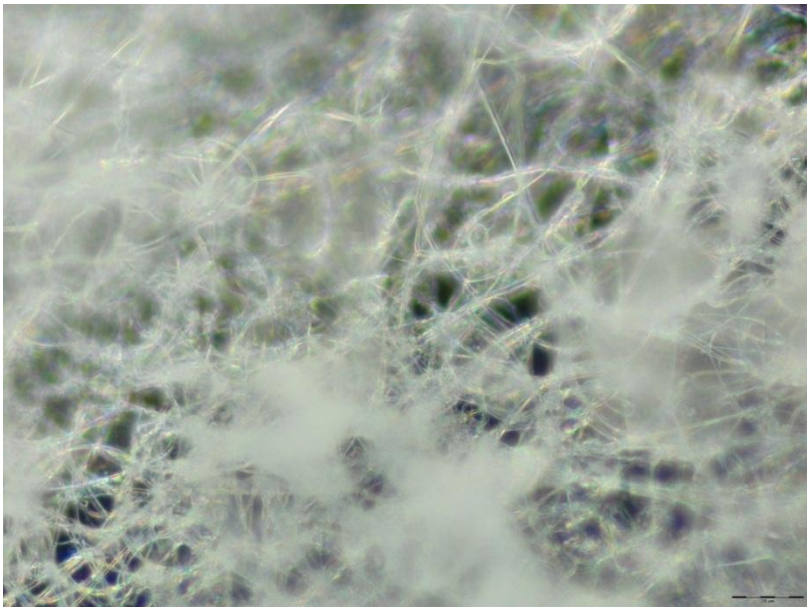


Slika 21. Nanovlakna PCL-a s nanočesticama bakra dobivena elektroispredanjem

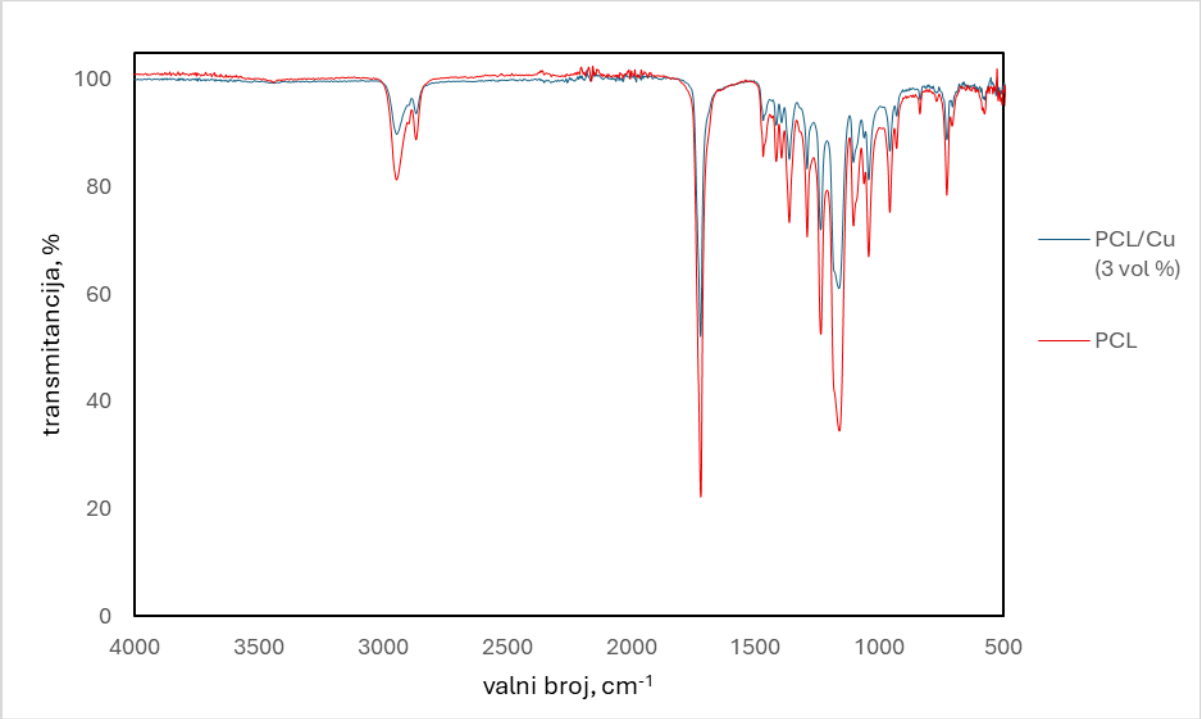
Slika 33. Nanovlakna PCL-a dobivena elektroispredanjem

Nadalje je provedena analiza uzorka optičkim mikroskopom. Materijal koji ne sadrži nanočestice bakra (slika 34. , slika 35.), već sam PCL otopljen u smjesi otapala, homogene je
strukture. Vlakna su nasumično orijentirana što je tipično za elektroispredan uzorak te nema kugličastih struktura [56]. Skala sugerira da se radi o nanovlaknima.

Kod elektroispredanja materijala koji sadrži nanočestice bakra i dalje je vidljiva nasumična orijentacija vlakana koja se međusobno isprepliću, međutim prisutna je blaga nehomogenost koja može upućivati na prisustvo aglomeriranih nanočestica bakra (slika 36., slika 37.).



Slika *22*. Elektroispredani materijal koji sadrži nanočestice bakra pri povećanju od 500 puta slikan optičkim mikroskopom



Slika *23*. FTIR spektar uzorka dobivenog elektroispredanjem PCL-a s nanočesticama bakra

Promatrajući FTIR spektar vidljivo je da su spektar čistog PCL-a i spektar PCL-a sa ugrađenim nanočesticama bakra gotovo identični. Uočljiva su sljedeća rastezanja: C=O rastezanje na 1720 cm^{-1} [57] te 2 signala na 2940 cm^{-1} i 2865 cm^{-1} karakteristična za C-H metilnu i metilensku grupu. Nije uočljiv karakterističan pik za bakar na valnoj duljini od oko 3420 cm^{-1} koji označava O-H istezanje i dodatno potvrđuje prisutnost bakra u ispitivanom uzorku, dok se ostali pikovi karakteristični za bakar preklapaju sa pikovima karakterističnim za PCL [58]. Ugradnja nanočestica bakra u PCL uzrokuje suptilne promjene u FTIR spektru, posebice oko karbonilnog vrha (~1720 cm^{-1}) i u području 1000–600 cm^{-1}. Ne pojavljuju se novi pikovi (npr. karakteristični za CuO ili Cu_2O), što znači da je koncentracija mala ili su interakcije slabije prirode.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada potvrdili su hipotezu da je moguće prirediti nanočestice bakra metodom zelene kemije, odnosno korištenjem ne toksičnih reagenasa. Prilikom sinteze nisu uočene značajne razlike između uzorka sa i bez stabilizatora osim u nijansi boje uzorka. Na temelju mikroskopskih slike uzoraka snimljene optičkim mikroskopom ukazano je na prisutnost nanočestica bakra te askorbinske kiseline na što upućuje polarizirana svjetlost na rubovima čestica. Prisutnost bakra potvrđene je na temelju narančasto-smeđih čestice koje upućuju na prisutnost metalnog bakra, dok narančasti tonovi sugeriraju prisutnost bakrovog (I) oksida. Kako bi se te tvrdnje dodatno potvrdile provedena je UV/Vis spektroskopija. Uočeno je da kod uzoraka 1 i 2 prisutan pad apsorbancije što potvrđuje prisutnost bakra. Razlog neobičnog oblika pika posljedica je samog instrumenta . Stabilnost samih uzoraka potvrđena je UV/Vis spektrometrijom dobivanjem identičnog spektra i nakon četiri dana. Provedbom pokusa pri manjim vrijednostima pH talog, a i sama otopina postaje crvena. Analiza UV/Vis spektrometra upučuje da je riječ o CuO što podupire i boja same otopine koja je tamno smeđa što je u skladi sa literaturom [50, 59, 60]. Za nastavak istraživanja i optimizacije preporuča se rad u inertnoj atmosferi. Provedbom pokusa koji uključuju isparavanje i simultanu separaciju čestica na površini stakla pri čemu je nastao efekt separacije cestica poznat kao *coffe ring* efekt utvrđeno je da su nastale nanočestice. Dobivene nanočestice bakra uspješno su ugrađene u nanoniti polikaprolaktona postupcima elektroispredanja. Dokazano je da je bakar pripomogao hidrofobnosti, odnosno potvrđeno je da je vrijeme upijanja kapi veće, što je veća koncentracija bakra u nanovlaknima. Time je dokazano da je odbijanje virusa, odnosno bakterija učikovitije, što je veća koncentracija bakra u površini. Usporedbom nanomaterijala dobivenog elektroispredanjem čistog PCL-a i uzorka PCL-a sa bakrom, vidljiva je promjena u debljini vlakana koja nam potvrđuje da je materijal 'ugrađen' u vlakna. Elektroispredanjem materijala koji sadrži nanočestice bakra postignuta je povećana hidrofobnost a samim time se očekuje veći antimikrobni učinak. Mjerenjem hidrofobnosti i optimizacijom izmjerenih vrijednosti dobiven je model čiji raspon pogreške upućuje na bolje ili lošije opisan sustav. Primjenom metode Dizajna eksperimenta uspješno je razvijen model koji opisuje utjecaj sastava smjese otapala na

hidrofobnost površine. Optimizacija sastava smjese provedena je metodom odzivnih površina, čime je uz minimalan broj pokusa postignuta učinkovita analiza sustava.

6. LITERATURA

[1] Mahanta, Urbashi, Mudrika Khandelwal, and Atul Suresh Deshpande. "Antimicrobial Surfaces: A Review of Synthetic Approaches, Applicability and Outlook." *Journal of Materials Science* 56, no. 32 (November 2021): 17915–41. https://doi.org/10.1007/s10853-021-06404-0.

[2] Cheeseman, Samuel, Andrew J. Christofferson, Rashad Kariuki, Daniel Cozzolino, Torben Daeneke, Russell J. Crawford, Vi Khanh Truong, James Chapman, and Aaron Elbourne. "Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications." *Advanced Science* 7, no. 10 (May 2020): 1902913. https://doi.org/10.1002/advs.201902913.

[3] Dikshit, Pritam, Jatin Kumar, Amit Das, Soumi Sadhu, Sunita Sharma, Swati Singh, Piyush Gupta, and Beom Kim. "Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications and Limitations." *Catalysts* 11, no. 8 (July 26, 2021): 902. https://doi.org/10.3390/catal11080902.

[4] Ogunsona, E. O., Muthuraj, R., Ojogbo, E., Valero, O., Mekonnen, T. H. Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review, *Applied Materials Today*, 18, 2019, str. 100473. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100473 (pristupljeno 2. 3. 2025.)

[5] Ortega-Nieto, Clara, Noelia Losada-Garcia, Doina Prodan, Gabriel Furtos, and Jose M. Palomo. "Recent Advances on the Design and Applications of Antimicrobial Nanomaterials." *Nanomaterials* 13, no. 17 (August 24, 2023): 2406. https://doi.org/10.3390/nano13172406.

[6] Barbosa, D.B., D.R. Monteiro, A.S. Takamyia, E.R. Camargo, A.M. Agostinho, A.C.B. Delbem, and J.P. Pessan. "Silver and Phosphate Nanoparticles." In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*, 187–202. Elsevier, 2013. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3127-5.00009-X.

[7] Ali, Arbab, Muhammad Ovais, Xuejing Cui, YuKui Rui, and Chunying Chen. "Safety Assessment of Nanomaterials for Antimicrobial Applications." *Chemical Research in Toxicology* 33, no. 5 (May 18, 2020): 1082–1109. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00519.

[8] Krasowska, Anna, and Karel Sigler. "How Microorganisms Use Hydrophobicity and What Does This Mean for Human Needs?" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (August 19, 2014). https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112.

[9] Sertić, A. (2015) Metode i dizajn eksperimentalnog postupka. Završni rad. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

[10] Kazi Madina Maraz and Ruhul Amin Khan. "An Overview on Impact and Application of Microorganisms on Human Health, Medicine and Environment." *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* 16, no. 1 (July 30, 2021): 089–104. https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.16.1.0200.

[11] Rusak, Gordana, Ana Katušić, and Sanja Penić. *Živi svijet 1*. 4. izdanje, 2012. Profil International, 2012.

[12] https://www.enciklopedija.hr/clanak/archaea, 20.12.2024. pristup

[13] Vugrinec, T. (2010) Uloga preživotinja u probavilu preživača. Završni rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

[14] Dolenec, Zdravko, and Gordana Rusak. *Živi svijet 2*. 4th ed. Profil International, 2013.

[15] Sun, D., M. Babar Shahzad, M. Li, G. Wang, and D. Xu. "Antimicrobial Materials with Medical Applications." *Materials Technology* 30, no. sup6 (August 30, 2015): B90–95. https://doi.org/10.1179/1753555714Y.0000000239.

[16] Augustus Kelechi, Ahamefule. "Mechanisms of Microbial Resistance to Known Antibiotics." *Science Journal of Public Health* 3, no. 5 (2015): 20. https://doi.org/10.11648/j.sjph.s.2015030501.14.

[17] Khan, Shahin Shah, Irfan Ullah, Sadeeq Ullah, Ruipeng An, Haijun Xu, Kaili Nie, Chaoyong Liu, and Luo Liu. "Recent Advances in the Surface Functionalization of Nanomaterials for Antimicrobial Applications." *Materials* 14, no. 22 (November 16, 2021): 6932. https://doi.org/10.3390/ma14226932.

[18] Pediatrics Northwest. *Pediatrics Northwest Fall/Winter 2024 Pediatric Education Series*; Pediatrics Northwest: Tacoma, WA, 2024. [PDF] https://www.pedsnw.net/assets/W1224781-Peds-NW-FallWinter-2024_Final-Single-Pages.pdf (pristup 20.12.2024.)

[19] Beyth, Nurit, Yael Houri-Haddad, Avi Domb, Wahid Khan, and Ronen Hazan. "Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015 (2015): 1–16. https://doi.org/10.1155/2015/246012.

[20] Xiong, Jing, Ye Wang, Qunji Xue, and Xuedong Wu. "Synthesis of Highly Stable Dispersions of Nanosized Copper Particles Using L-Ascorbic Acid." *Green Chemistry* 13, no. 4 (2011): 900. https://doi.org/10.1039/c0gc00772b.

[21] Benassai, Emilia, Massimo Del Bubba, Claudia Ancillotti, Ilaria Colzi, Cristina Gonnelli, Nicola Calisi, Maria Cristina Salvatici, Enrico Casalone, and Sandra Ristori. "Green and Cost-Effective Synthesis of Copper Nanoparticles by Extracts of Non-Edible and Waste Plant Materials from Vaccinium Species: Characterization and Antimicrobial Activity." *Materials Science and Engineering: C* 119 (February 2021): 111453. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111453.

[22] Juan, Liao. "Deposition of Silver Nanoparticles on Titanium Surface for Antibacterial Effect." *International Journal of Nanomedicine*, April 2010, 261. https://doi.org/10.2147/IJN.S8810

[23] Vafaei, Saeid, and Theodorian Borca-Tasciuc. "Role of Nanoparticles on Nanofluid Boiling Phenomenon: Nanoparticle Deposition." *Chemical Engineering Research and Design* 92, no. 5.

[24] Nishimoto S, Bhushan B (2013) Bioinspired self-cleaning surfaces with superhydrophobicity, superoleophobicity, and superhydrophilicity. RSC Adv 3:671–690. https://doi.org/ 10.1039/C2RA21260A

[25] Tuson, Hannah H., and Douglas B. Weibel. "Bacteria–Surface Interactions." *Soft Matter* 9, no. 17 (2013): 4368. https://doi.org/10.1039/c3sm27705d.

[26] Whitehead, K.A., and J. Verran. "The Effect of Surface Topography on the Retention of Microorganisms." *Food and Bioproducts Processing* 84, no. 4 (December 2006): 253–59. https://doi.org/10.1205/fbp06035.

[27] Lappin- Scott, Hilary M., and J. William Costerton. *Microbial Biofilms*. The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1995.

[28] Stoica, P., M.C. Chifiriuc, M. Rapa, and V. Lazăr. "Overview of Biofilm-Related Problems in Medical Devices." In *Biofilms and Implantable Medical Devices*, 3–23. Elsevier, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100382-4.00001-0.

[29] Vlăsceanu, G.M., A.M. Holban, and A.M. Grumezescu. "Alternative Strategies to Reduce the Incidence of Severe Infections." In *Biofilms and Implantable Medical Devices*, 195–221. Elsevier, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100382-4.00009-5.
[30] Harms, H., K. E. C. Smith, and L. Y. Wick. "Microorganism-Hydrophobic Compound Interactions." In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, edited by Kenneth N. Timmis, 1479–90. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_101.
[31] Fletcher, Madilyn, and K. C. Marshall. "Bubble Contact Angle Method for Evaluating Substratum Interfacial Characteristics and Its Relevance to Bacterial Attachment." *Applied and Environmental Microbiology* 44, no. 1 (July 1982): 184–92. https://doi.org/10.1128/aem.44.1.184-192.1982.
[32] N. Mozes and P.G. Rouxhet. "Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms" Journal o f Microbiological Methods 6 (August 18, 1986)
[33] Aleksandar Jankovic, Gaurav Chaudhary, Francesco Goia, Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems, Energy and Buildings, 250, 2021, 111298, ISSN 0378-7788, https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298.
[34] Journal Article; DOI; Design of Experiments; Mark J. Anderson,Martin A. Bezener; 16 Sep 2024 - Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Tec... - pp 1-38
[35] Adatrao, Sagar, and Andrea Sciacchitano. "Design of Experiments: A Statistical Tool for PIV Uncertainty Quantification," 2021.
[36] Sagbas, A, F Kahraman, and U Esme. "MODELING AND PREDICTING ABRASIVE WEAR BEHAVIOUR OF POLY OXY METHYLENES USING RESPONSE SURFACE METHODOLGY AND NEURAL NETWORKS," n.d.
[37] Book Chapter; DOI; Statistical Design of Experiments for Reaction Modelling and Optimisation, Paul Kay,Benjamin Ingham,James Winterburn, 20 Dec 2023, (Royal Society of Chemistry) - pp 303-318
[38] Book Chapter; DOI; Experimental Design and Statistics in Animal Research; Tanja Högg,David Willé,Simon T. Bate; 01 Jan 2024, pp 29-45
[39] Sorzano, Carlos Oscar S. "Statistical Experiment Design for Animal Research." Open Science Framework, June 2, 2023. https://doi.org/10.31219/osf.io/e9s25.
[40] Kreim, May Joda. "Synthesis and Characterization of Copper Nanoparticles by Chemical Method Using Ascorbic Acid as a Reducing Agent in Presence of Metronidazole Benzoate (MTZ.B) (1-(2-Benzyloxy Ethyl)-5-Nitro Methyl Imidazole) Drug," n.d.
[41] Luraghi, Andrea, Francesco Peri, and Lorenzo Moroni. "Electrospinning for Drug Delivery Applications: A Review." *Journal of Controlled Release* 334 (June 2021): 463–84. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.033.
[42] Dung Dang, Thi My, Thi Thu Tuyet Le, Eric Fribourg-Blanc, and Mau Chien Dang. "The Influence of Solvents and Surfactants on the Preparation of Copper Nanoparticles by a Chemical Reduction Method." *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 2, no. 2 (June 1, 2011): 025004. https://doi.org/10.1088/2043-6262/2/2/025004.
[43] Dhas, N. Arul, C. Paul Raj, and A. Gedanken. "Synthesis, Characterization, and Properties of Metallic Copper Nanoparticles." *Chemistry of Materials* 10, no. 5 (May 1, 1998): 1446–52. https://doi.org/10.1021/cm9708269.
[44] Joshi, S.S., S.F. Patil, V. Iyer, and S. Mahumuni. "Radiation Induced Synthesis and Characterization of Copper Nanoparticles." *Nanostructured Materials* 10, no. 7 (January 1998): 1135–44. https://doi.org/10.1016/S0965-9773(98)00153-6.
[45] Kaminskienė, Ž., I. Prosyčevas, J. Stonkutė, and A. Guobienė. "Evaluation of Optical Properties of Ag, Cu, and Co Nanoparticles Synthesized in Organic Medium." *Acta Physica Polonica A* 123, no. 1 (2013): 111. https://doi.org/10.12693/APhysPolA.123.111.
[46] Mohammed, Mohammed Shareef, and Seenaa Essa Kadhim. "Study of the Optical and Structural Properties of Copper Nanoparticles Prepared via the Electrochemical Technique." *Journal of Optics*, September 28, 2024. https://doi.org/10.1007/s12596-024-02178-1.
[47] Vukić, Ivna. "Optička svojstva nanočestica CuO," n.d.
[48] Lu, Ruihan, Wuchang Hao, Long Kong, Keliang Zhao, Hao Bai, and Zhenguo Liu. "A Simple Method for the Synthesis of Copper Nanoparticles from Metastable Intermediates." *RSC Advances* 13, no. 21 (2023): 14361–69. https://doi.org/10.1039/D3RA01082A.
[49] Yunker, Peter J., Tim Still, Matthew A. Lohr, and A. G. Yodh. "Suppression of the Coffee-Ring Effect by Shape-Dependent Capillary Interactions." *Nature* 476, no. 7360 (August 2011): 308–11. https://doi.org/10.1038/nature10344.
[50] Deegan, Robert D., Olgica Bakajin, Todd F. Dupont, Greb Huber, Sidney R. Nagel, and Thomas A. Witten. "Capillary Flow as the Cause of Ring Stains from Dried Liquid Drops." *Nature* 389, no. 6653 (October 23, 1997): 827–29. https://doi.org/10.1038/39827.
[51] Huang, H. H., F. Q. Yan, Y. M. Kek, C. H. Chew, G. Q. Xu, W. Ji, P. S. Oh, and S. H. Tang. "Synthesis, Characterization, and Nonlinear Optical Properties of Copper Nanoparticles." *Langmuir* 13, no. 2 (January 1, 1997): 172–75. https://doi.org/10.1021/la9605495.
[52] Khan, Ayesha, Audil Rashid, Rafia Younas, and Ren Chong. "A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Copper Nanoparticles." *International Nano Letters* 6, no. 1 (March 2016): 21–26. https://doi.org/10.1007/s40089-015-0163-6.
[53] Zhou, Ying, Hong Zhao, Yujian He, Nan Ding, and Qian Cao. "Colorimetric Detection of Cu2+ Using 4-Mercaptobenzoic Acid Modified Silver Nanoparticles." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 391, no. 1–3 (November 2011): 179–83. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.07.026.
[54] "Ascorbic Acid (Vitamin C) Crystal | Nikon Small World." (pristup 4.6.2025.) https://www.nikonsmallworld.com/galleries/1980-photomicrography-competition/ascorbic-acid-vitamin-c-crystal3.
[55]https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Carbonate#section=Toxicity-Summary , 28.12.2024.
[56] Zheng, Jie, Xu Yan, Meng-Meng Li, Gui-Feng Yu, Hong-Di Zhang, Wojciech Pisula, Xiao-Xiao He, Jean-Luc Duvail, and Yun-Ze Long. "Electrospun Aligned Fibrous Arrays and Twisted Ropes: Fabrication, Mechanical and Electrical Properties, and Application in Strain Sensors." *Nanoscale Research Letters* 10, no. 1 (December 2015): 475. https://doi.org/10.1186/s11671-015-1184-9.
[57] Quilez-Molina, Ana Isabel, Suset Barroso-Solares, Violeta Hurtado-García, José Alejandro Heredia-Guerrero, María Luz Rodriguez-Mendez, Miguel Ángel Rodríguez-Pérez, and Javier Pinto. "Encapsulation of Copper Nanoparticles in Electrospun Nanofibers for Sustainable Removal of Pesticides." *ACS Applied Materials & Interfaces* 15, no. 16 (April 26, 2023): 20385–97. https://doi.org/10.1021/acsami.3c00849.

[58] Jankovic, Zoran, Miroslav Pavlovic, Marijana Pantovic-Pavlovic, Nebojsa Nikolic, Vladan Zecevic, and Miomir Pavlovic. "Electrical Conductivity of Poly (L Lactic Acid) and Poly (3-Hydroxybutyrate) Composites Filled with Galvanostatically Produced Copper Powder." *Hemijska Industrija* 72, no. 5 (2018): 285–92. https://doi.org/10.2298/HEMIND180530020J
[59] El-Trass, A., H. ElShamy, I. El-Mehasseb, and M. El-Kemary. "CuO Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Optical Properties and Interaction with Amino Acids." *Applied Surface Science* 258, no. 7 (January 2012): 2997–3001. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.11.025.
[60] Dagher, Sawsan, Yousef Haik, Ahmad I. Ayesh, and Nacir Tit. "Synthesis and Optical Properties of Colloidal CuO Nanoparticles." *Journal of Luminescence* 151 (July 2014): 149–54. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.02.015.