

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Jelena M. Cvetićanin

**FUNKCIONALIZOVANI MATERIJALI NA
BAZI UGLJENIČNIH NANOCEVI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Jelena M. Cvetićanin

**FUNCTIONALIZED MATERIALS BASED
ON CARBON NANOTUBES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

MENTORI:

1. Dr Gordana Ćirić-Marjanović, vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu
2. Dr Olivera Nešković, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

3. Dr Ivanka Holclajtner-Antunović, redovni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu
4. Dr Gordana Joksić, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____, Beograd

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke Vinča.

Ovom prilikom bih želela da se zahvalim mojim mentorima, dr Oliveri Nešković, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu, i dr Gordani Ćirić-Marjanović, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu na stručnoj i prijateljskoj pomoći i podršci.

Dr Ivanki Holclajtner-Antunović, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, želela bih da se zahvalim na saradnji i korisnim i stručnim diskusijama vezanim za ovaj rad.

Dr Gordani Joksić, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu bih želela da se zahvalim na ostvarenoj saradnji i stručnoj i prijateljskoj pomoći.

Želela bih da se zahvalim svima koji su doprineli ovom radu, dr Aleksandri Radosavljević naučnom saradniku Instituta Vinča, na saradnji i pomoći u delu koji se odnosi na radiolitičku funkcionalizaciju, dr Zlatku Rakočeviću naučnom savetniku Instituta Vinča, na saradnji prilikom snimanja i obrade STM slika, dr Vasilu Koteskom i dr Jeleni Belošević-Čavor, višim naučnim saradnicima Instituta Vinča na saradnji i pomoći u delu koji se odnosi na teorijska izračunavanja, dr Andreji Leskovac naučnom saradniku Instituta Vinča na saradnji i korisnim sugestijama tokom čitanja teksta.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, mojim roditeljima, Veselinki i Miloradu, a iznad svega mojoj sestri Jovani, koji su moja najveća podrška.

FUNKCIONALIZOVANI MATERIJALI NA BAZI UGLJENIČNIH NANOCEVI

REZIME

Ugljenične nanocevi (CNT) predstavljaju jedinstvene jednodimenzionalne makromolekule. Obzirom da zahvaljujući svojoj karakterističnoj strukturi pokazuju neobične osobine, te da postoje mogućnosti njihove primene u različitim oblastima, to je razvoj i unapređenje metoda za dobijanje novih materijala na bazi ugljeničnih nanocevi od velikog značaja.

Cilj istraživanja u okviru ove disertacije je ispitivanje različitih metoda prečišćavanja ugljeničnih nanocevi, razvoj nove metode za funkcionalizaciju ugljeničnih nanocevi klasterima srebra čime bi se dobili novi funkcionalizovani nano materijali, te ispitivanje genotoksičnosti ugljeničnih nanocevi.

Za prečišćavanje ugljeničnih nanocevi primenjene su dve različite metode. Prva metoda predstavlja kombinaciju žarenja i tretiranja kiselinom, a druga se zasniva na korišćenju polimera. Za karakterizaciju uzoraka pre i posle prečišćavanja korišćena je SEM mikroskopija.

U cilju uspešne funkcionalizacije ugljeničnih nanocevi klasterima srebra, primenjena je jednostavna i efikasna jednostepena metoda funkcionalizacije jednoslojnih ugljeničnih nanocevi (SWCNT) i višeslojnih ugljeničnih nanocevi (MWCNT) korišćenjem gama zračenja. Po prvi put, poli(vinil alkohol) (PVA) je uspešno korišćen za redukciju metalnih jona srebra bez prisustva bilo kog drugog redukujućeg agensa. Funkcionalizacija se odvija vezivanjem polimera za površinu CNT i simultanom redukcijom Ag^+ jona pod dejstvom gama zračenja. Osim razvoja metode za funkcionalizaciju CNT cilj istraživanja je bio i da se ispita potencijal dva različita hemijska puta funkcionalizacije i redukciona sposobnost različitih redukcionih vrsta nastalih pod dejstvom gama zračenja. Optičke osobine dobijenih uzoraka i mehanizam funkcionalizacije CNT su ispitani korišćenjem UV-vis i FTIR spektroskopije. Funkcionalizovane CNT su vizuelizovane korišćenjem

mikroskopskih tehnika TEM i STM. Prisustvo Ag u uzorcima funkcionalizovanih nanocevi je potvrđeno i korišćenjem EDX tehnike.

Da bi se ispitala stabilnost i veličina radiolitički dobijenih klastera srebra kojim su funkcionalizovane CNT korišćena je metoda MALDI TOF masene spektrometrije i vršena su teorijska *ab initio* izračunavanja. Osim potvrde o stabilnosti dobijenih klastera, MALDI TOF masena spektrometrija ukazuje na određene klasterne posebne stabilnosti što je vezano za elektronsku konfiguraciju klastera, što su potvrdila i teorijska izračunavanja.

Obzirom na činjenicu da je pitanje toksičnosti ugljeničnih nanocevi veoma značajno a i da je predmet naučne debate, ispitana je genotoksičnost SWCNT, MWCNT i amid-funkcionalizovanih SWCNT, a sa ciljem utvrđivanja efekta koji CNT imaju na ispitivane ćelijske kulture i ispitivanja kako funkcionalizacija CNT, generalno gledano, utiče na njihovu genotoksičnost. Ispitivana je genotoksičnost na humanim limfocitima korišćenjem citokinezis-blok mikronukleus testa (CBMN) i rađena je analiza γ -H2AX fokusa čime je kvantifikovan broj dvolančanih prekida DNK u humanim fibroblastima. SWCNT indukuju nastanak mikronukleusa (MN) u limfocitima i smanjuju proliferacioni potencijal (CBPI) ćelija. U fibroblastima ista količina SWCNT indukuje γ -H2AX fokuse više nego u kontrolnom uzorku (bez SWCNT). Amid-funkcionalizovane SWCNT ne remete proliferacioni potencijal limfocita, ali indukuju mikronukleuse u većoj meri nego SWCNT. Kada se primene na fibroblaste amid-funkcionalizovane SWCNT takođe indukuju γ -H2AX fokuse u većoj meri nego kontrolni uzorci. MWCNT u najvećoj meri indukuju nastanak mikronukleusa i anafaznih mostova između jedara, ali ne indukuju γ -H2AX fokuse u meri u kojoj se očekuje na osnovu mikronukleus testa, što ukazuje da se MWCNT ponašaju kao klastogeni i aneugeni agens istovremeno.

Ključne reči: ugljenične nanocevi, funkcionalizacija, klasteri srebra, genotoksičnost

Naučna oblast: fizička hemija

Uža naučna oblast: fizička hemija materijala, fizička hemija makromolekula

UDK: 544.25:[544.163+544.526.5](043.3)

FUNCTIONALIZED MATERIALS BASED ON CARBON NANOTUBES

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNT) represent unique one-dimensional macromolecules. Since due to its characteristic structure they are showing unusual properties and that there are possibilities of their application in various fields, the development of methods for obtaining new materials based on carbon nanotubes is of great importance.

The goal of investigation in this thesis is an investigation of different carbon nanotube purification methods, development of a new method of functionalization of carbon nanotubes with silver clusters with the aim of obtaining new functionalized nanomaterials, and the investigation of genotoxicity of carbon nanotubes.

Two different methods of carbon nanotubes purification were applied. First method is a combination of etching and acid treatment, and the other method is based on using of polymer. For characterization of the samples before and after purification, SEM microscopy was used.

With the aim of successful functionalization of carbon nanotubes with silver clusters, simple and efficient one-step functionalization method of single walled carbon nanotubes (SWCNT) and multi walled carbon nanotubes (MWCNT) using gamma irradiation was used. For the first time, poly(vinyl alcohol) PVA is successfully utilized to reduce silver (Ag) metal ions without having any additional reducing agents. Functionalization takes place through anchoring of the polymer to the surface of CNT and simultaneous reduction of Ag^+ ions under the γ -irradiation. Beside development of the method for functionalization of CNTs the aim of this investigation was also to investigate the potential of two different chemical routes and the reduction ability of different reduction species produced under the γ -irradiation. Optical properties of as-prepared samples and CNT functionalization mechanism were investigated using UV-vis and FTIR spectroscopy. Functionalized CNT were visualized using microscopic techniques: transmission electron microscopy (TEM) and scanning tunneling microscopy (STM). Also,

the presence of Ag in the samples of functionalized carbon nanotubes was confirmed using energy dispersive X-ray spectroscopy.

In order to investigate the size and the stability of radiolitically produced silver clusters which functionalized CNTs, MALDI TOF mass spectrometry method and theoretical *ab initio* calculations were applied. Except the information about the stability of obtained clusters, MALDI TOF mass spectrometry indicates some clusters of particular stability, related to the cluster's electronic configuration, which was also confirmed by theoretical calculations.

Considering the fact of the importance of the question of carbon nanotube toxicity and the fact that their toxicity is still under debate, genotoxicity of SWCNT, MWCNT and amide-functionalized SWCNT was investigated in order to determine the effects they show and investigate the influence of functionalization on CNT toxicity. Genotoxic properties were investigated on cultured human lymphocytes employing cytokinesis block micronucleus assay and enumeration of γ -H2AX foci as a measure of double strand breaks (DSBs) of the DNA in normal human fibroblasts. SWCNTs induce micronuclei (MN) formation in lymphocytes and decrease the proliferation potential (CBPI) of cells. In a fibroblast cell line the same dose of SWCNTs induces γ -H2AX foci higher than in a control sample. Amide-functionalized SWCNTs do not disturb the cell proliferation potential of harvested lymphocytes, but induce micronuclei to a higher extent than SWCNTs. When applied on fibroblasts, amide-functionalized SWCNTs also induce γ -H2AX foci, to a higher extent than the control samples. MWCNTs show the highest incidence of induced lymphocyte micronuclei and anaphase bridges among nuclei, but do not induce γ -H2AX foci as high as expected by the micronucleus test, indicating that MWCNT acts as a clastogen and aneugen agent simultaneously.

Keywords: carbon nanotubes, functionalization, silver clusters, genotoxicity

Scientific field: physical chemistry

Scientific discipline: physical chemistry of materials, physical chemistry of macromolecules

UDK: 544.25:[544.163+544.526.5](043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
I TEORIJSKI DEO	2
Ugljenik i ugljenični materijali	2
I.1 Ugljenične nanocevi	4
I.1.1. Sinteza ugljeničnih nanocevi	7
I.1.1.1. Metoda lučnog pražnjenja	8
I.1.1.2. Laserska ablacija	10
I.1.1.3. CVD metoda	10
I.1.2. Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi	11
I.1.2.1. Oksidacija	12
I.1.2.2. Žarenje	13
I.1.2.3. Ultrasonifikacija	13
I.1.2.4. Magnetno prečišćavanje	14
I.1.2.5. Mikro filtracija	14
I.1.2.6. Funkcionalizacija	14
I.1.2.7. Sečenje	14
I.1.2.8. Hromatografija	15
I.1.2.9. Prečišćavanje polimerom	15
I.1.3. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi	16
I.1.3.1. Nekovalentna funkcionalizacija	17
I.1.3.2. Endohedralna funkcionalizacija	18
I.1.3.3. Kovalentna funkcionalizacija	19
I.1.4. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi klasterima srebra	20
I.1.4.1. Korišćenje γ zračenja za funkcionalizaciju ugljeničnih nanocevi	23
I.1.5. Primena ugljeničnih nanocevi	25
I.1.5.1. Primena CNT funkcionalizovanih srebrom	28
I.1.6. Toksičnost ugljeničnih nanocevi	29
I.2. Biomonitoring genotoksičnosti i citotoksičnosti	31
I.2.1. CBMN test	31
I.2.2. Dvolančani prekidi DNK	34

II CILJ RADA	36
III EKSPERIMENTALNI DEO	37
III.1. Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi	37
III.2. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi klasterima srebra	38
III.2.1. Materijal	39
III.2.2. Sinteza Ag/CNT kompozita	39
III.2.3. Instrumentalne metode	40
III.3. Genotoksičnost ugljeničnih nanocevi	42
III.3.1. Materijal	42
III.3.2. Čelijska kultura-humane krvne ćelije	42
III.3.3. Mikronukleus test	42
III.3.4. Čelijska kultura fibroblasta	43
III.3.5. Imunocitohemijska fluorescencija	43
IV REZULTATI I DISKUSIJA	45
IV.1. Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi	45
IV.2. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi klasterima srebra	50
IV.2.1. MALDI TOF i teorijska ispitivanja klastera srebra dobijenih gama zračenjem	63
IV.2.1.1. Teorijska izračunavanja	69
IV.3. Genotoksičnost ugljeničnih nanocevi	76
V ZAKLJUČAK	87
VI LITERATURA	89
BIOGRAFIJA	101

UVOD

Od otkrića ugljeničnih nanocevi do danas prošlo je više od dvadeset godina. Iako za današnju nauku ovo nije nimalo kratak period, ugljenične nanocevi zahvaljujući svojim izuzetnim osobinama i dalje predstavljaju veliki potencijal za istraživanja.

Obzirom na postojanje različitih načina sinteze ugljeničnih nanocevi i dobijanja pri tom materijala različite čistoće, prečišćavanje dobijenog materijala je veoma bitno.

Proces proizvodnje materijala na bazi ugljeničnih nanocevi je znatno otežan zahvaljujući međusobnom vezivanju i time rezultujućom nerastvorljivošću nanocevi. Stoga funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi predstavlja osnovu u njihovom daljem izučavanju i proizvodnji novih materijala, a sa ciljem njihovog daljeg procesuiranja i primene.

Kako ugljenične nanocevi predstavljaju dobar potencijal za primene u biomedicini, a na prvom mestu zbog njihove sposobnosti da prodru u ćeliju, to je ispitivanje njihove toksičnosti od velikog značaja, a u cilju procene toksičnih efekata u odnosu na prednosti koje imaju.

U ovoj doktorskoj disertaciji, čija su tema funkcionalizovani materijali na bazi ugljeničnih nanocevi, predstavljeni su rezultati prečišćavanja ugljeničnih nanocevi, pri čemu su poređene različite metode prečišćavanja, rezultati funkcionalizacije ugljeničnih nanocevi klasterima srebra korišćenjem nove jednostepene metode gama zračenja i poređenjem dva različita sistema, i rezultati ispitivanja citotoksičnosti (genotoksičnosti) nefunkcionalizovanih i funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi sa ciljem ispitivanja uticaja funkcionalizacije na toksičnost nanocevi.

Osnovne celine iz kojih se sastoji ova doktorska disertacija su: teorijski deo, u kome je dat pregled literature koja se odnosi na strukturu i svojstva, potom sintezu, prečišćavanje, funkcionalizaciju, primenu i toksičnost ugljeničnih nanocevi; eksperimentalni deo u kome je dat kratak prikaz eksperimentalnih procedura, opis korišćenih materijala i eksperimentalnih metoda za karakterizaciju uzoraka i treći deo u kome su dati i prodiskutovani dobijeni rezultati i koji je podeljen na tri dela koji se odnose na prečišćavanje, funkcionalizaciju i ispitivanje genotoksičnosti ugljeničnih nanocevi.

I TEORIJSKI DEO

Ugljenik i ugljenični materijali

Ugljenik je šesti element u periodnom sistemu elemenata i ima najniži atomski broj od svih elemenata IV grupe periodnog sistema. Svaki atom ugljenika ima šest elektrona, smeštenih u $1s^2$, $2s^2$ i $2p^2$ atomske orbitale, odnosno dva elektrona smeštena u $1s^2$ orbitalu a preostala četiri popunjavaju $2s^2 2p^2$ atomske orbitale. Ova četiri elektrona se nazivaju valentni elektroni. $2s$, $2p_x$, $2p_y$ i $2p_z$ orbitale su značajne za formiranje kovalentnih veza ugljeničnih materijala. Kako je energetska razlika između ovih atomskih orbitala mala to postoji mogućnost da se ove orbitale mešaju. Mešanje $2s$ i $2p$ atomskih orbitala se naziva hibridizacija, pri čemu se mešanje jednog $2s$ elektrona sa jednim, dva ili tri $2p$ elektrona zove sp^n hibridizacija, $n = 1, 2, 3$.

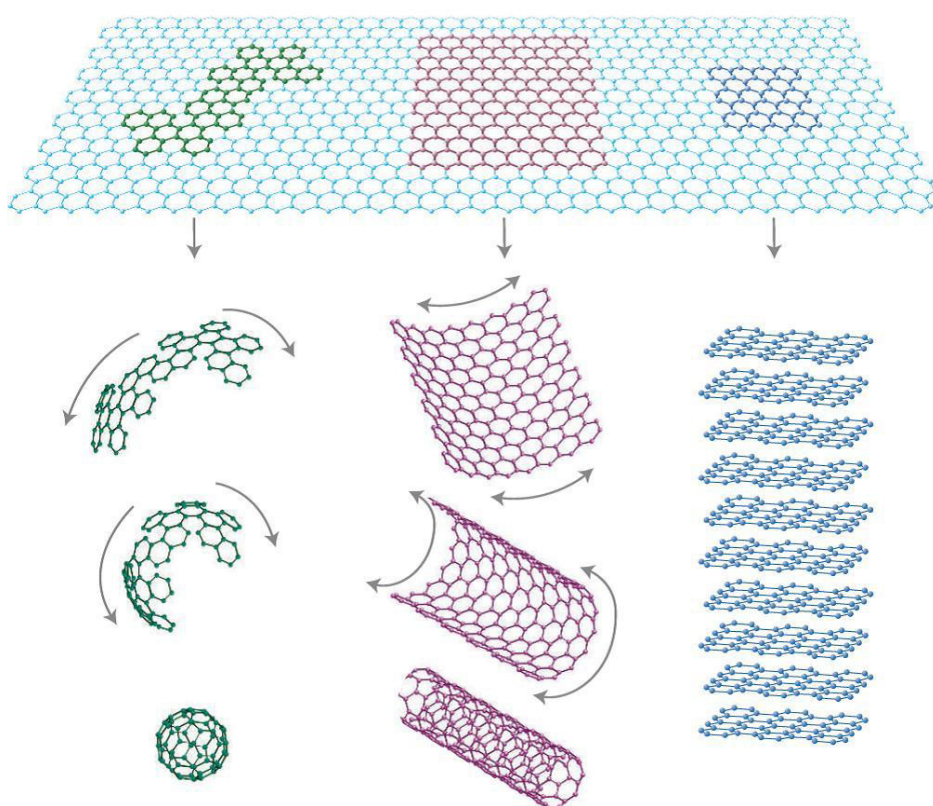
Za razliku od ostalih elemenata IV grupe, kao što su Si i Ge, kod kojih se javlja uglavnom sp^3 hibridizacija, kod ugljenika su moguće sledeće hibridizacije: sp , sp^2 i sp^3 . Ugljenik se razlikuje od Si i Ge utoliko što ugljenik nema unutrašnje atomske orbitale, osim sferne $1s$ orbitale, a odsustvo obližnjih unutrašnjih orbitala olakšava hibridizaciju uključujući samo valentne s i p orbitale za ugljenik. Za sp vezivanje je karakteristična lančana struktura, za sp^2 vezivanje ravanska struktura a za sp^3 tetraedarska struktura.

Prve poznate alotropske modifikacije ugljenika bile su grafit i dijamant. Grafit je forma čistog ugljenika koja se najčešće nalazi u prirodi, a čija je struktura sastavljena od slojeva heksagonalno uređenih atoma ugljenika (grafen), koji su sp^2 hibridizovani. Unutar slojeva svaki atom ugljenika je jakim vezama vezan za tri susedna atoma. Četvrti vezujući elektron učestvuje u slabim π vezama između slojeva. Dijamant, forma ugljenika koja se znatno ređe sreće u prirodi ima kubnu kristalnu strukturu, gde je svaki atom ugljenika, koji je sp^3 hibridizovan, kovalentno vezan za četiri susedna atoma u temenima pravilnog tetraedra.

Treća alotropska modifikacija ugljenika, fuleren, predstavlja sferični ugljenični molekul, sastavljen od petočlanih i šestočlanih prstenova. Njegovim otkrićem 1985. godine [1] dat je podsticaj sistematičnom izučavanju ugljeničnih vlakana veoma malih dimenzija.

Priča o ugljeničnim nanocevima zvanično počinje 1991. godine kada je Iijima [2] otkrio postojanje višeslojnih ugljeničnih nanocevi kao "nus-proizvoda" prilikom sinteze fullerena. Dve godine kasnije dve grupe naučnika, jedna koju je predvodio Iijima [3] i druga na čijem čelu je bio Bethune [4] eksperimentalno su došle do otkrića jednoslojnih ugljeničnih nanocevi.

Grafen, odnosno monosloj ugljenikovitih atoma pakovanih u dvodimenzionu (2D) rešetku u obliku saća, je osnovni gradivni blok grafitnih materijala drugih dimenzionalnosti [5], slika 1. Može biti umotan u 0D fullerene, urolan u 1D nanocevi ili naslagan u 3D grafit.

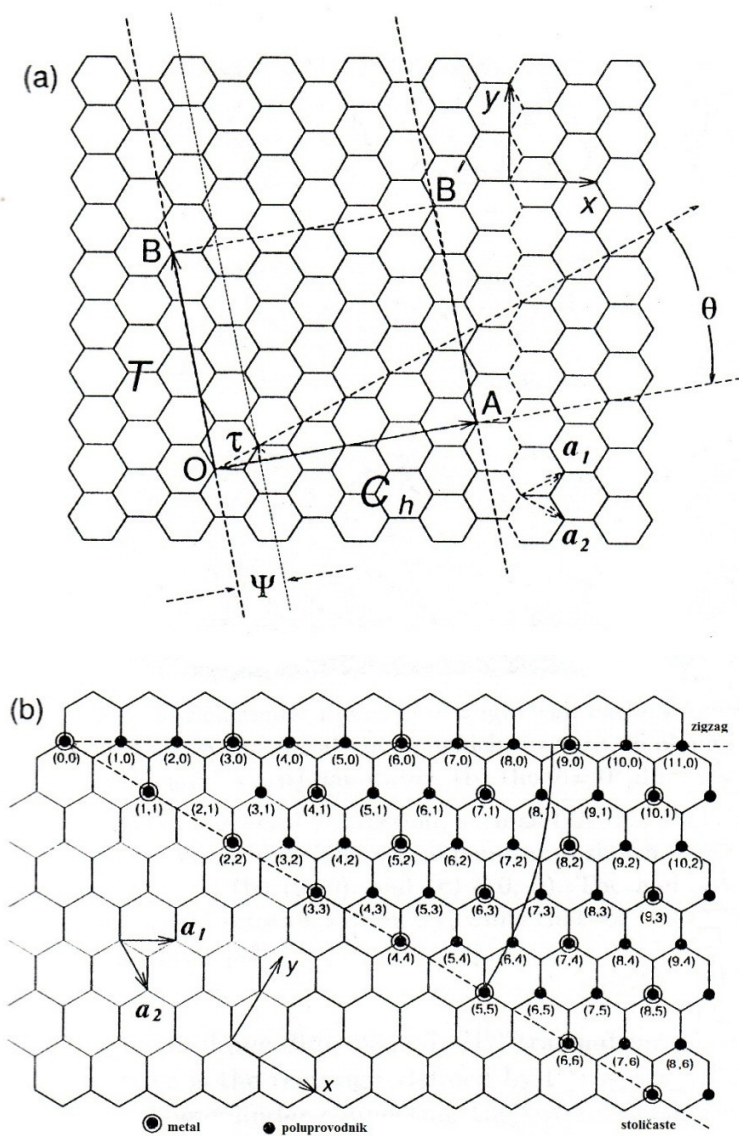


Slika 1. Osnov svih grafitnih formi, grafen, je 2D gradivni materijal za ugljenične materijale svih drugih dimenzionalnosti. Može biti umotan u 0D fullerene, urolan u 1D nanocevi ili naslagan u 3D grafit [5]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz Nature Materials, The rise of graphene, autora A. K. Geim, K. S. Novoselov, 6, 183. Copyright (2007) Nature Publishing Group.

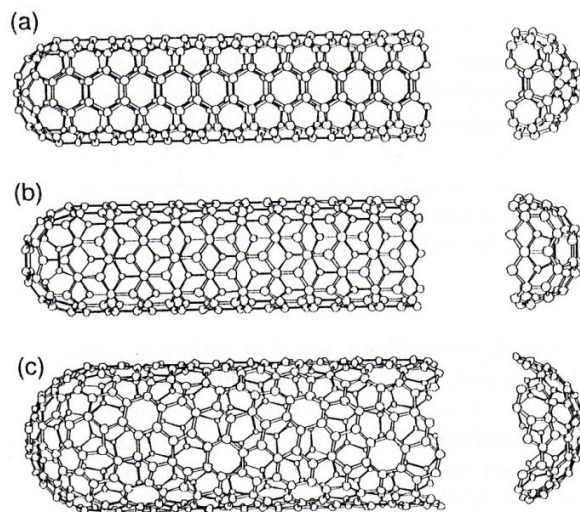
I.1 Ugljenične nanocevi

Jednoslojne ugljenične nanocevi (Single Walled Carbon Nanotube – SWCNT) mogu se smatrati dugim, urolanim slojevima grafena. Prečnik im je nanometarskih dimenzija (tipično između 0,7 i 1,4 nm), a dužina i nekoliko hiljada puta veća od prečnika, te se mogu smatrati jednodimenzionim strukturama. Sastoje se iz dva dela, zida cevi i kapica fullerenske strukture na vrhovima cilindra.

Za prikazivanje obima bilo koje nanocevi koristi se hiralni vektor $C_h = na_1 + ma_2$ koji povezuje dva kristalografski ekvivalentna mesta 2D grafenskog sloja (*Slika 2a*) [6]. *Slika 2a* prikazuje hiralni ugao θ između hiralnog vektora C_h i "zigzag" pravca ($\theta = 0$) i jedinične vektore heksagonalne rešetke grafenskog sloja a_1 i a_2 . Kao što je prikazano na slici 3, u zavisnosti od vrednosti gore navedenih parametara, tri različita tipa strukture nanocevi mogu nastati rolanjem grafenskog sloja u cilindar. Zigzag nanocevi odgovaraju hiralnom uglu od $\theta = 0$, stoličaste hiralnom uglu od $\theta = 30^\circ$, a hiralne nanocevi uglu $0 < \theta < 30^\circ$. U (n, m) obeležavanju za $C_h = na_1 + ma_2$, vektori $(n, 0)$ ili $(0, m)$ označavaju zigzag nanocevi a vektori (n, n) označavaju stoličaste nanocevi. Svi ostali vektori (n, m) odgovaraju hiralnim nanocevima [7, 8]. Hiralnost nanocevi je dakle određena orijentacijom šestočlanog ugljeničnog prstena rešetke u odnosu na osu nanocevi. SWCNT različitih hiralnosti imaju različite osobine kao što su optička aktivnost, mehanička čvrstoća i električna provodljivost. *Slika 2b* ukazuje na nanocevi koje su poluprovodne i one metalne provodnosti.



Slika 2. (a) Hiralni vektor OA ili $C_h = na_1 + ma_2$ definisan je na rešetci ugljenikovitih atoma jediničnim vektorima a_1 i a_2 , i hiralnim uglom θ u odnosu na cik-cak osu. Duž cik-cak ose ugao θ je 0° . Prikazani su i vektor rešetke jedinične ćelije 1D nanocevi $OB = T$, rotacioni ugao ψ i translaciona jedinica τ koji čine osnovnu operaciju simetrije $R = (\psi/\tau)$ za ugljenične nanocevi. Dijagram je konstruisan za $(n, m) = (4, 2)$. (b) Mogući vektori određeni su parom celih brojeva (n, m) za ugljenične nanocevi, uključujući zigzag, stoličaste i hiralne nanocevi. Uokvirene tačke označavaju nanocevi metalne provodnosti, dok tačke označavaju poluprovodne nanocevi [6]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz Carbon, Physics of carbon nanotubes, autora M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, 33, 883. Copyright (1995) Elsevier.

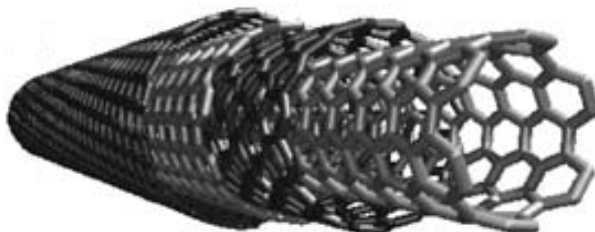


Slika 3. Šematski modeli za jednoslojne ugljenične nanocevi sa osom nanocevi normalnom na hiralni vektor, koji je duž (a) pravca $\theta = 30^\circ$ („stoličaste“ (n, n) nanocevi), (b) pravca $\theta = 0^\circ$ („zigzag“ $(n, 0)$ nanocevi), (c) opšti θ pravac, kao što je vektor OB (slika 2), gde je $0 < \theta < 30^\circ$ („hiralne“ (n, m) nanocevi). Nanocevi prikazane na slici odgovaraju (n, m) vrednostima od: (a) (5, 5), (b) (9, 0) i (c) (10, 5) [6]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz Carbon, Physics of carbon nanotubes, autora M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, 33, 883. Copyright (1995) Elsevier.

Električna provodljivost nanocevi zavisi od prečnika i hiralnosti nanocevi, odnosno od vrednosti (n, m) . "Stoličaste" odnosno (n, n) nanocevi imaju metalna svojstva. Pored stoličastih, može se smatrati da sve (n, m) nanocevi kod kojih je $n - m = 3j$ (gde je j ceo broj različit od nule) takođe imaju metalna svojstva. Sve ostale nanocevi se ponašaju kao poluprovodnici [9]. Ukoliko su sve vrednosti hiralnih vektora podjednako verovatne, može se očekivati da jedna trećina svih SWCNT ima metalna svojstva dok su preostale dve trećine poluprovodnici, što je i potvrđeno prilikom sinteze [10].

Višeslojne ugljenične nanocevi (Multi Walled Carbon Nanotube - MWCNT) se sastoje od koncentričnih jednoslojnih ugljeničnih nanocevi različitih prečnika. Prečnik MWCNT može biti i do 100 nm. Postoje dva modela koja se koriste za opisivanje strukture MWCNT. "Russian doll" model podrazumeva da su slojevi grafena urolani i poređani u

koncentrične cilindre, dok model "pergamenta" podrazumeva da je jedan sloj grafena urolan sam oko svoje ose i nalikuje svitku pergamenta. Rastojanje između slojeva u MWCNT je 0,34 nm i blisko je rastojanju između slojeva grafena u grafitu [10]. Na slici 4 je dat šematski prikaz MWCNT koji bi odgovarao "Russian doll" modelu.



Slika 4. Višeslojna ugljenična nanocev [11]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz Springer eBook, Functionalization of Carbon Nanotubes, autora A. Hirsch, O. Vostrowsky, Copyright (1969) Springer.

I.1.1. Sinteza ugljeničnih nanocevi

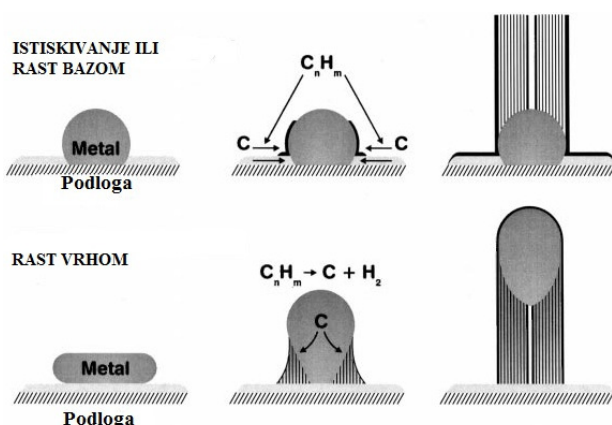
U ovom poglavlju ukratko će biti opisane različite metode sinteze ugljeničnih nanocevi. Prvo će biti objašnjen mehanizam rasta, obzirom da se isti može smatrati uopštenim za sve metode.

Postoje tri osnovne metode za sintezu nanocevi: lučno pražnjenje (arc discharge), laserska ablacija (laser ablation) i hemijska depozicija iz parne faze (chemical vapour deposition - CVD). Laserskom ablacijom i metodom lučnog pražnjenja nastaju male količine čistih nanocevi. CVD metoda kao rezultat najčešće daje MWCNT ili SWCNT lošeg kvaliteta koje imaju veliki opseg prečnika, što se teško može kontrolisati [12].

U samom mehanizmu formiranja nanocevi postoje tri koraka. Prvo se na površini čestice metalnog katalizatora formira prekursor za nastanak nanocevi i fulerena, C_2 . Od ove metastabilne karbidne čestice, brzo nastaje ugljenik štapičaste strukture. Potom dolazi do

spore grafitizacije zida ove strukture. Ovaj mehanizam je baziran na *in situ* TEM zapažanjima [13].

Postoji nekoliko teorija o mehanizmu rasta nanocevi. Jedna teorija [14] polazi od toga da su čestice metalnog katalizatora pokretne ili su podržane grafitom ili nekom drugom podlogom. Pretpostavlja se da su čestice katalizatora sferne ili oblika kruške i da će se depozicija ugljenikovih atoma odigravati samo na jednoj polovini površine. Ugljenik difunduje duž koncentracionog gradijenta i taloži se. Posmatrano u odnosu na čestice metala, CNT se mogu formirati "istiskivanjem" (odnosno rastom baze) gde nanocevi rastu naviše od metalnih čestica koje ostaju vezane za podlogu ili "rastom vrha" gde se čestice otkae i pomeraju na vrh rastuće nanocevi. Ovi mehanizmi su ilustrovani na slici 5. Zavisno od veličine čestica katalizatora, nastaju SWCNT ili MWCNT.



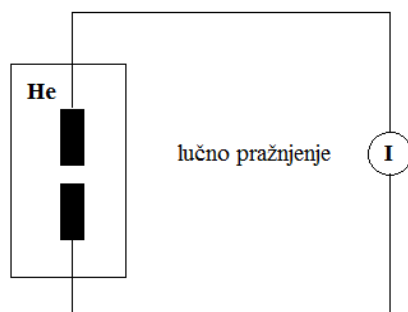
Slika 5. Šematski prikaz mogućeg mehanizma rasta CNT [14]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz Chemical Physics Letters, Model of carbon nanotube growth through chemical vapor deposition, autora S. B. Sinnott, R. Andrews, D. Qian, A. M. Rao, Z. Mao, E. C. Dickey, F. Derbyshire, 315, 25. Copyright (1999) Elsevier.

I.1.1.1. Metoda lučnog pražnjenja

Metoda lučnog pražnjenja [15] je u početku korišćena za proizvodnju fulerena C_{60} . Obzirom na jednostavnost metode ona predstavlja najčešći i najlakši način proizvodnje nanocevi i odlična je metoda za proizvodnju kako MWCNT tako i SWCNT [16]. Kako se

ovom metodom dobija smeša komponenata to je potrebno razdvojiti nanocevi od čađi i metalnih katalizatora koji se nalaze u sirovom proizvodu.

Dve grafitne elektrode na međusobnom rastojanju od oko 1 mm, smeštene su u prostor koji je ispunjen inertnim gasom (helijum, argon) na niskom pritisku. Jednosmerna struja od 50 do 100 A, pri naponu od oko 20 V, stvara visokotemperaturno pražnjenje između dve elektrode. Pražnjenje dovodi do otparavanja jedne od ugljeničnih šipki, gde kondenzovanjem nastaje depozit koji pored nanocevi sadrži različite fullerene i ugljeničnu čađ.



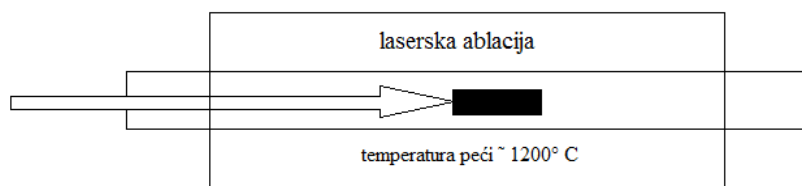
Slika 6. Šematski prikaz metode lučnog pražnjenja.

Ukoliko je cilj metode lučnog pražnjenja dobijanje SWCNT tada jedna elektroda mora sadržati metalni katalizator, kao što je Fe, Co, Ni, Y. Kvalitet i kvantitet tako dobijenih nanocevi zavisiće od koncentracije metala, pritiska i vrste inertnog gasa, struje i geometrije sistema. Prečnik ovako dobijenih cevi je od 1,2 do 1,4 nm.

Korišćenjem obe grafitne elektrode, glavni produkt će biti MWCNT, čiji je unutrašnji prečnik 1-3 nm, a spoljni oko 10 nm. Kako u proces sinteze nije uključen katalizator, to nije potrebno prečišćavanje kiselinom, što znači da MWCNT mogu biti sintetisane sa malo defekata.

I.1.1.2. Laserska ablacija

Aparatura za lasersku ablaciju [17] se sastoji od grafitne mete zatvorene u atmosferi inertnog gasa pod niskim pritiskom. Pulsni ili kontinualni laser se koristi za isparavanje grafitne mete koja se greje u peći na 1200°C. Hlađenjem isparenog ugljenika dolazi do njegove brze kondenzacije i formiranja klastera na površini gasnog katalizatora. Od ovih inicijalnih klastera, tubularni molekuli rastu u SWCNT dok čestice katalizatora ne postanu prevelike ili dok uslovi ne postanu takvi da ugljenik više ne može da difunduje preko površine čestica katalizatora. Moguće je i da čestice postanu toliko omotane ugljeničnim slojem da ne mogu više apsorbovati i nanocev prestaje da raste.



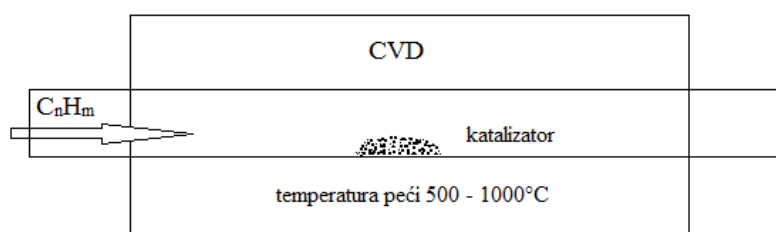
Slika 7. Šematski prikaz metode laserske ablacije.

Prilikom korišćenja čistih grafitnih elektroda biće sintetisane MWCNT, dok uniformne SWCNT mogu biti sintetisane ako se koristi smeša grafita sa Co, Ni, Fe ili Y, umesto čistog grafita. Lasersko isparavanje daje bolji prinos sinteze i bolje osobine SWCNT nego lučno pražnjenje. Nanocevi proizvedene laserskom ablacijom su čistije (oko 90% čistoće) nego one proizvedene metodom lučnog pražnjenja, a prečnik ovako dobijenih SWCNT je 1-2 nm.

I.1.1.3. CVD metoda

Sinteza hemijskom depozicijom iz parne faze (CVD metoda – chemical vapour deposition) [18] zahteva izvor ugljenika u gasnoj fazi i korišćenje izvora energije, kao što je plazma ili grejani kalem, za prenos energije gasnim molekulima ugljenika. Najčešće

korišćeni izvori gasovitog ugljenika su metan, ugljen monoksid i acetilen. Izvor enegrije služi da „rasprsnje“ molekule u reaktivni atomski ugljenik. Potom ugljenik difunduje ka supstratu, koji je obložen katalizatorom (Ni, Fe ili Co), i tu se vezuje. Ukoliko su zadovoljeni odgovarajući parametri biće formirane nanocevi. Dobijanje preferentno SWCNT u odnosu na MWCNT je moguće korišćenjem odgovarajućeg metalnog katalizatora [14]. CVD metoda omogućuje kontrolu prečnika kao i brzine rasta nanocevi. Temperature za sintezu nanocevi CVD metodom su od 650 do 900°C [19, 20]. Tipični prinosi CVD metode su oko 30%.



Slika 8. Šematski prikaz CVD metode.

Postoje različite modifikacije CVD metode, kao što su plazmom poboljšana CVD, termalno hemijska CVD, alkohol katalitička CVD, rast iz parne faze, aero gel potpomognuta CVD i laser potpomognuta CVD.

I.1.2. Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi

Obzirom da je za primenu ugljeničnih nanocevi veoma bitna njihova čistoća, a da različitim procesima sinteze nastale nanocevi sadrže dosta nečistoća, to njihovo prečišćavanje ima veoma veliki značaj. Glavne nečistoće nastale procesom sinteze ugljeničnih nanocevi su grafit, amorfni ugljenik, metalni katalizator i manji fulereni. Uobičajene industrijske tehnike koriste oksidacione i kiselinske tehnike prečišćavanja koje imaju i efekat na strukturu nanocevi. Tehnike prečišćavanja nanocevi mogu biti podeljene

na dve vrste, one koje vrše strukturnu selekciju i one koje vrše selekciju po veličini. Prve će odvajati nanocevi od nečistoća, a druge će dati homogeniju raspodelu prečnika ili veličine.

U tehnike prečišćavanja spadaju oksidacija, tretman kiselinom, kaljenje, ultrasonifikacija, mikro filtracija, feromagnetna separacija, sečenje, funkcionalizacija, hromatografske tehnike, prečišćavanje polimerom.

I.1.2.1. Oksidacija

Metode oksidacije se često koriste za prečišćavanje nanocevi zbog njihove praktičnosti, relativne jednostavnosti, primenljivosti na metalne katalizatore i amorfni ugljenik, kao i zbog mogućnosti prečišćavanja velike količine nanocevi. Osim toga, ove metode mogu dovesti do uvođenja funkcionalnih grupa, kao što su karboksilne grupe, koje služe kao polazna tačka za dalju površinsku hemiju nanocevi [21, 22]. Ove metode obuhvataju oksidacioni tretman tečnom fazom, kao što je tretiranje kiselinom i oksidaciju gasnom fazom, korišćenjem O_2 , H_2 ili vazduha.

Prilikom tretiranja ugljeničnih nanocevi kiselinom najčešće se koriste azotna kiselina (HNO_3), sumporna (H_2SO_4) i hlorovodonična kiselina (HCl) u različitim koncentracijama. HNO_3 i H_2SO_4 imaju oksidativna svojstva i mogu da reaguju sa aromatičnim sistemima, naročito kada su koncentrovane, kada su moguće i reakcije nitrovanja i sulfonovanja aromatičnih sistema [23, 24]. Sa druge strane HCl nema oksidacione sposobnosti i kada se primenjuje za prečišćavanje CNT najčešće je to zbog dejstva koje ima na metalni katalizator [25, 26]. Osim što tretman kiselinom može izazvati defekte na bočnim zidovima nanocevi [27], može biti korišćen i za selektivno spaljivanje i sužavanje prečnika ili dužine nanocevi [23, 28]. Pažljivim izborom parametara koji određuju uslove prečišćavanja, dobijeni materijal može biti skoro potpuno oslobođen neželjenjih nusproizvoda a nanocevi ostati nedirnute.

Glavni nedostatak prečišćavanja ugljeničnih nanocevi oksidacijom je što tom prilikom ne dolazi samo do oksidacije nečistoća već i nanocevi. Srećom oštećenja nanocevi su manja nego oštećenja nečistoća. Nečistoće su uglavnom zakačene na metalni katalizator,

koji deluje i kao oksidujućí katalizator, pa je iz tog razloga oksidacija nećistoća prioritetna [23, 29]. Efikasnost i prinos procedure zavise od dosta faktora, kao što su sadržaj metala, vreme oksidacije, okruženje, oksidujuće sredstvo i temperatura [12]. Pažljivom procenom uslova oksidativnog tretmana potrebno je izbalansirati zahteve za uklanjanjem nećistoća sa onim o očuvanju strukture nanocevi i prinosa, da bi bila obezbeđena dalja obradivost nanocevi [30].

I.1.2.2. Źarenje

Źarenjem ugljeniĉnih nanocevi na visokim temperaturama (873 – 1873 K) doći će do njihovog preuređenja, nećistoće ugljeniĉnog porekla i fulereni će pirolizovati, a korišćenjem visokotemperaturnog vakuumskeg tretmana (1873 K) metal će biti otopljen i uklonjen.

I.1.2.3. Ultrasonifikacija

Ultrasonifikacija se kombinuje skoro sa svim tehnikama prećišćavanja jer ultrazvuĉnim tretiranjem uzoraka može da dođe do oslobađanja mnogih nanocevi od ĉestica koje su slepljene [15]. Zahvaljujući izlaganju ultrazvuĉnim vibracijama, aglomerati razliĉitih nanoĉestica biće primorani da vibriraju i postaće mnogo disperzniji. Razdvajanje ĉestica u velikoj meri zavisi od rastvaraĉa i korišćenog reagensa. Rastvaraĉ utiĉe na stabilnost dispergovanih nanocevi u sistemu, pa su tako u slabim rastvaraĉima SWNT stabilnije ako su vezane za metal, dok su u nekim rastvaraĉima kao što su alkoholi monodispergovane ĉestice relativno stabilne [29, 31]. Kada se koristi kiselina, ĉistoća SWNT zavisi od vremena izlaganja. Kada je vreme izlaganja kiselinu kratko rastvara se samo metal, dok dužim vremenom izlaganja dolazi do hemijskog sećenja i skraćivanja nanocevi [32].

I.1.2.4. Magnetno prečišćavanje

Magnetno prečišćavanje podrazumeva mehaničko uklanjanje feromagnetnih čestica katalizatora. Suspenzija SWCNT se meša sa neorganskim nanočesticama (ZrO_2 ili $CaCO_3$) u ultrazvučnom kupatilu i izlaže delovanju magnetnog polja, koje privlači feromagnetne čestice. Metoda je veoma jednostavna i samim tim pogodna za dobijanje malih količina SWCNT oslobođenih magnetnih nečistoća, a koje naknadnim hemijskim tretmanima postaju SWCNT visoke čistoće.

I.1.2.5. Mikro filtracija

Mikro filtracija se zasniva na odvajanju čestica po veličini. Nanocevi i mala količina ugljeničnih nanočestica su zarobljene u filteru. Druge nanočestice (metalni katalizatori, fulereni i ugljenične nanočestice) prolaze kroz filter.

Tako je na primer jedan od načina odvajanja fulerena od nanocevi mikrofiltracijom potapanje dobijenog materijala nanocevi i nečistoća u CS_2 rastvor. Fulereni, koji se za razliku od nanocevi rastvaraju u CS_2 , prolaze kroz filter [31] i na taj način bivaju odvojeni od nanocevi.

I.1.2.6. Funkcionalizacija

Funkcionalizacija se zasniva na vezivanju različitih funkcionalnih grupa na ugljenične nanocevi, čime nastaju nanocevi koje su rastvorljivije od nečistoća. Na ovaj način nanocevi se lako odvajaju od nečistoća kao što su metali, filtracijom. Nakon prečišćavanja funkcionalne grupe mogu jednostavno biti uklonjene termalnim tretmanom, kao što je žarenje.

I.1.2.7. Sečenje

Sečenje nanocevi može biti indukovano hemijski, mehanički ili kombinacijom ovih metoda. Hemijsko sečenje nanocevi može se postići delimičnom funkcionalizacijom

nanocevi, npr. fluorom [33]. Fluorisani ugljenik će biti uklonjen sa bočnog zida pirolizom kao CF₄ ili COF₂, ostavljajući za sobom hemijski sečene nanocevi.

I.1.2.8. Hromatografija

Hromatografija se uglavnom koristi za razdvajanje male količine nanocevi u frakcije sa malom distribucijom dužine i prečnika. Nanocevi, koje prolaze kroz kolonu sa poroznim materijalom, moraju biti dispergovane [34] ili rastvorene [35], što se postiže tretiranjem u ultrazvučnoj kadi ili funkcionalizacijom rastvornim grupama.

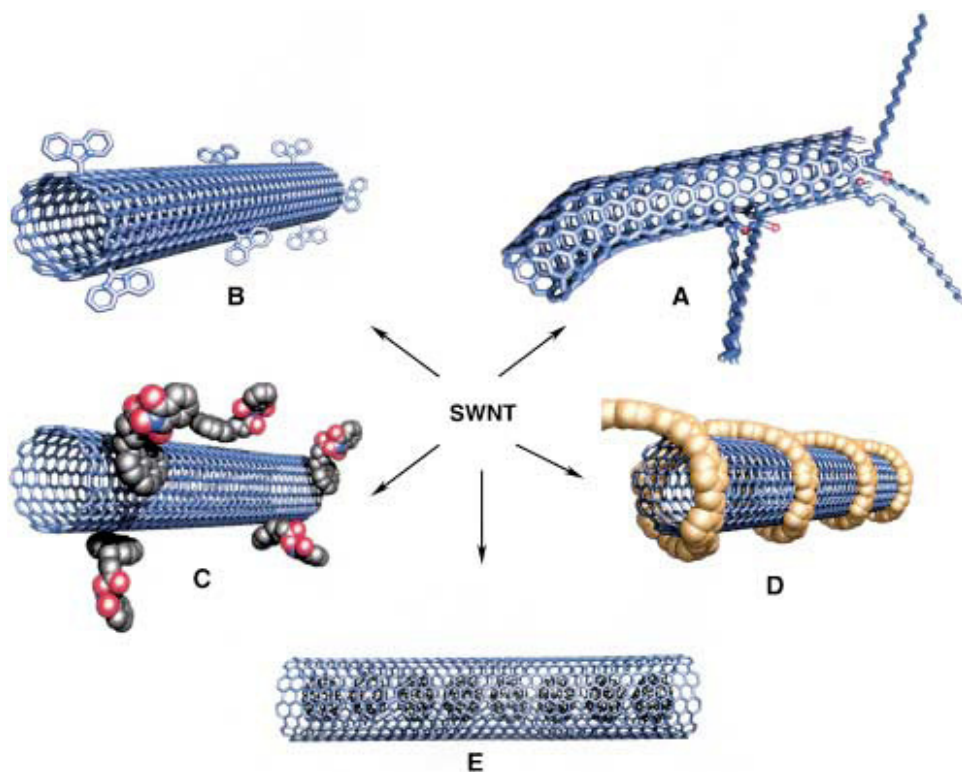
I.1.2.9. Prečišćavanje polimerom

Prečišćavanje polimerom se zasniva na razlici Van der Waals-ovih potencijala između nanocevi i hemijskog okruženja. Zahvaljujući van der Waals-ovim interakcijama, organski polimeri sa benzenovim prstenima imaju tendenciju da formiraju polimer-nanocев kompozitne rastvore. Tako se grafitne nečistoće izdvajaju kao talog u ovim rastvorima, ostavljajući stabilnu suspenziju polimer-nanocевi iznad. Polimerni matriks se uklanja filtracijom i dobijaju se prečišćene nanocevi. Molekulsko dinamička studija o interakciji između polimera i ugljeničnih nanocevi pokazuje da su ove interakcije najjače za konjugovane polimere sa aromatičnim prstenovima na polimernom lancu, obzirom da ovi prstenovi imaju mogućnost da se poredaju paralelno površini nanocevi i time obezbede jaku međupovršinsku adheziju [36]. Poredeći polimere polistiren (PS), poliftalamid (PPA), poli(*m*-fenilen-vinilen-*co*-2,5dioktil-*p*-fenilen-vinilen) (PmPV) i poli(fenilen-vinilen) (PPV) pokazano je da PmPV pokazuje najizraženiju interakciju zahvaljujući kombinovanoj fleksibilnosti u strukturi i fleksibilnim bočnim lancima.

I.1.3. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi

Uprkos jedinstvenoj strukturi i izuzetnim osobinama SWCNT njihova primena je u velikoj meri otežana zbog spajanja nanocevi do kog dolazi zahvaljujući jakim međumolekularnim van der Waals-ovim silama. Rezultujuća nerastvorljivost nanocevi znatno otežava dalji proces proizvodnje materijala na bazi nanocevi. Povećanje rastvorljivosti i biokompatibilnosti nanocevi je glavni cilj u realizaciji njihove primene. Za prevazilaženje ovih teškoća ključnu ulogu igra funkcionalizacija nanocevi. Nakon vezivanja hemijskih funkcionalnih grupa na površinu nanocevi one mogu biti multifunkcionalne što ih čini idealnim kandidatima za primene u biomedicini i elektronici.

Postoje različiti načini funkcionalizacije ugljeničnih nanocevi koji se mogu naći u literaturi, gde su najvažniji predstavljeni na slici 9. Glavni pristupi funkcionalizaciji mogu biti grupisani u tri kategorije: (a) kovalentno vezivanje hemijskih grupa reakcijama na π -konjugovanom skeletu CNT- kovalentna funkcionalizacija; (b) nekovalentna adsorpcija ili obmotavanje različitih funkcionalnih molekula - nekovalentna funkcionalizacija; (c) endohedralno punjenje unutrašnjih šupljina nanocevi - endohedralna funkcionalizacija.



Slika 9. Mogućnosti funkcionalizacije CNT: (A) funkcionalizacija preko defektnih grupa, (B) kovalentna funkcionalizacija bočnih zidova, (C) nekovalentna egzohedralna funkcionalizacija surfaktantima, (D) nekovalentna egzohedralna funkcionalizacija polimerima, (E) endohedralna funkcionalizacija (u ovom slučaju sa C₆₀) [37]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz *Angewandte Chemie International Edition*, *Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes*, autora Andreas Hirsch, 41, 1853. Copyright (2002) John Wiley and Sons.

I.1.3.1. Nekovalentna funkcionalizacija

Nekovalentna funkcionalizacija zasniva se na stvaranju supramolekulskih kompleksa korišćenjem različitih adsorpcionih sila kao što su van der Waals-ove sile i π - π interakcije. U poređenju sa hemijskom funkcionalizacijom, nekovalentna funkcionalizacija ima prednost što može da se odvija pri blagim reakcionim uslovima i nema uticaja na

elektronsku strukturu nanocevi, čije posebne elektronske i optičke osobine tako ostaju očuvane. Nekovalentne interakcije CNT podrazumevaju formiranje nekovalentnih agregata sa surfaktantima (površinski aktivnim molekulima), obmotavanje nanocevi polimerima, uključujući i DNK [38], nekovalentne interakcije biomolekula i nanocevi [39]. Postoji mnogo konkretnih primera nekovalentnih interakcija, gde će u nastavku teksta biti izdvojeno nekoliko. Proteini i oligonukleotidi mogu biti nekovalentno vezani na spoljašnji zid nanocevi što može biti vizuelizovano transmisionom elektronskom mikroskopijom visoke rezolucije [40]. Nespecifične interakcije su moguće i prilikom pravljenja hibrida SWCNT i nanočestica. Tako na primer nanocevi mogu biti dekorisane nanočesticama zlata koje su vezane za bočne zidove nekovalentnim hidrofobnim interakcijama [41] ili elektrostatičkim privlačenjem naelektrisanih nanočestica zlata i suprotno naelektrisanih polimer funkcionalizovanih CNT [42]. Metal oksidne nanočestice (npr. nanočestice ZnO ili MgO) se mogu nekovalentno vezivati za bočne zidove MWCNT korišćenjem voda-ulje mikroemulzija [43]. Suspenzija prečišćenih nanocevi u prisustvu polimera, kao što je PmPV, u organskim rastvaračima kao što je CHCl_3 , vodi obmotavanju polimera oko nanocevi (slika 9 D) [44, 45]. Osobine ovih supramolekulskih jedinjenja su značajno drugačije od onih koje imaju pojedinačne komponente. Na primer, SWCNT/PmPV kompleks pokazuje osam puta veću provodljivost od one koju ima čist polimer. Polimer uniformno obmotava nanocevi, a formiranjem kompleksa nakupine nanocevi bivaju razbijene. Obmotavanje SWCNT polimerima koji nose polarne bočne lance, kao što su poli(vinil-pirolidon) (PVP) ili poli(stiren-sulfonat) (PSS), vodi nastajanju stabilnih rastvora SWCNT/polimer kompleksa u vodi [46].

I.1.3.2. Endohedralna funkcionalizacija

Endohedralna funkcionalizacija podrazumeva smeštanje atoma ili malih molekula u unutrašnju šupljinu nanocevi (slika 9 E). Endohedralna hemija metala i metalnih soli je intenzivno proučavana [47, 48, 49], dok ugrađivanje fulerena C_{60} [50], C_{70} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84} [51] ili endohedralnih fulerena, kao što su na primer $\text{Sm}@C_{82}$ [52], $\text{Gd}@C_{82}$ [53], $\text{Sc}_2@C_{84}$ [54], $\text{La}_2@C_{80}$ [55] predstavlja posebno impresivne primere endohedralne hemije

SWCNTs. Inkapsulirani fulereni teže da formiraju lance koji su spojeni van der Waals-ovim silama. Ove strukture se nazivaju "peapods". Pokazano je da zagrevanjem C₆₀ peapods-a na 1200°C, jednodimenzioni C₆₀ lanac može biti transformisan u unutrašnju cev, što rezultuje nastankom dvostruke ugljenične nanocevi [56].

MWCNT otvorene na krajevima obezbeđuju unutrašnje šupljine (prečnika 2-10 nm) u koje mogu biti smešteni biomolekuli odgovarajuće veličine. Pokazano je da mali proteini, kao što je laktamaza, mogu biti uneti u šupljine nanocevi [57]. DNK takođe može da uđe u šupljine nanocevi, a DNK transport može direktno biti praćen fluorescentnom spektroskopijom [58]. Molekulske dinamičke simulacije su pokazale da DNK oligonukleotid koji se sastoji od osam baza može biti inkapsuliran u CNT u vodenoj sredini [59].

I.1.3.3. Kovalentna funkcionalizacija

Kovalentna funkcionalizacija se zasniva na formiranju kovalentne veze između funkcionalnih entiteta i ugljeničnog kostura nanocevi. Može biti podeljena na direktnu kovalentnu funkcionalizaciju bočnih zidova i indirektnu kovalentnu funkcionalizaciju sa karboksilnim grupama na površini CNT. Direktna kovalentna funkcionalizacija bočnih zidova je povezana sa promenom hibridizacije iz sp² u sp³ i simultanim gubitkom konjugacije. Ova funkcionalizacija će biti uspešna ukoliko se koriste visokoreaktivni reagensi. Polazeći od inertnosti bočnih zidova nanocevi, fluorovanje je izabrano za inicijalne studije funkcionalizacije, korišćenjem tehnologije razvijene za fluorovanje grafita [60]. Prečišćene SWCNT su tretirane elementarnim fluorom na temperaturama između 150°C i 600°C. Za produkte sintetisane na 600°C, stepen fluorovanja je 0,1-1. Kovalentna veza sa fluorom je potvrđena IC spektroskopijom, C-F valentnim vibracijama na 1220-1250 cm⁻¹. Fluorovanje SWCNT ima za posledicu drastičnu promenu njihovih elektronskih osobina. Za razliku od netretiranih SWCNT, koju pokazuju visoku električnu provodljivost, nanocevi fluorovane iznad 250°C su izolatori. Tretiranje fluorovanih nanocevi hidrazinom na sobnoj temperaturi dovodi do defluorovanja. Ramanska spektroskopija defluorovanih nanocevi pokazuje da je fluorovanje na višim temperaturama praćeno delimičnom

fluorolizom ugljenične mreže. Fluorovane SWCNT mogu biti rastvorene u alkoholima korišćenjem ultrazvučnog kupatila [61] i tako mogu postati dostupne za dalje transformacije korišćenjem mokre hemije. Na taj način, atomi fluora u fluorovanim SWCNT mogu biti zamenjeni alkil grupama tretiranjem Grinjarovim [62] ili organolitijum reagensima. Rezultujuće alkilovane nanocevi se lako disperguju u različitim organskim rastvaračima.

Direktna funkcionalizacija bočnih zidova nanocevi organskim grupama je moguća korišćenjem reaktivnih vrsta kao što su nitreni, karbeni i radikali [63, 64].

Indirektna kovalentna funkcionalizacija koristi hemijske transformacije karboksilnih grupa na otvorenim krajevima nanocevi i rupama na bočnim zidovima. Ove karboksilne grupe su mogle postojati na tek proizvedenim nanocevima ali i nastati tokom oksidativnog prečišćavanja. Mesta oštećena oksidativnim prečišćavanjem smatraju se defektima. Ovakve nanocevi reaguju sa alkoholima ili aminima i dovode do nastanka estarskih ili amidnih veza, respektivno. Ovaj metod funkcionalizacije vodi delimičnom gubitku elektronske strukture/optičkih osobina nanocevi i gubitku materijala usled oksidativnog procesa [65].

I.1.4. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi klasterima srebra

Postoje različite strategije funkcionalizacije nanocevi, zasnovane na nekovalentnom i kovalentnom vezivanju različitih struktura na površinu nanocevi. To mogu biti nanočestice, mikročestice, mali organski molekuli, polimeri itd. Postoje brojni primeri obmotavanja CNT različitim metalima, a u cilju primene CNTs. Mnogi metali pokazuju slabe interakcije sa bočnim zidom CNT, pri čemu su ove interakcije najčešće van der Waals-ove prirode. U cilju funkcionalizacije CNT metalnim nanočesticama, a uzimajući u obzir njihove male energije vezivanja [66] neophodno je modifikovati ekstremno inertnu površinu CNT u cilju formiranja željenih funkcionalnih grupa koje imaju mogućnost vezivanja metalnih klastera.

Značajni istraživački naponi su posvećeni funkcionalizaciji CNT nanočesticama srebra [67-72]. Većina ovih tehnika koje uključuju elektrohemijski ili neki drugi hemijski

ili fizički pristup, zahteva ili predtretman CNT kao što je oksidacija jakim kiselinom ili funkcionalizaciju surfaktantima ili polielektrolitima, međutim tretiranje nanocevi kiselinom može dovesti do oštećenja i skraćivanja nanocevi usled pucanja veza.

CNT/Ag nanohibride su jednostavnom metodom sintetisali Gao i saradnici [73] na taj način što su u prisustvu CNT funkcionalizovanih karboksilnim grupama ili CNT na koje je kalemljena poli(akrilna kiselina)- (PAA-), *in situ* generisali nanočestice srebra iz AgNO_3 vodenog rastvora bez ikakvog dodatnog redukujućeg agensa ili zračenja. Ovako dobijene nanočestice srebra vezale su se na površinu nanocevi. Pokazali su da je metoda primenjiva na SWCNT, DWCNT, MWCNT i polimerom funkcionalizovane CNT. Nanočestice srebra dobijene ovom metodom su veličine od 2 nm do 10-20 nm.

Za vezivanje Ag nanočestica na N-dopirane CNT, Zamudio i saradnici [74] su prvo sintetisali Ag nanočestice prosečnih prečnika 2-10 nm redukcijom AgNO_3 u dva različita rastvarača (DMSO i DMF) korišćenjem u nekim slučajevima i stabilizatora natrijum citrat dihidrata ($\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Zatim su u suspenziju Ag nanočestica dodali azot dopirane MWCNT što je dovelo do uniformnog obmotavanja površine nanocevi Ag nanočesticama. Uočili su takođe da ukoliko za ovu metodu koriste nedopirane CNT dolazi do veoma slabog obmotavanja CNT nanočesticama Ag.

Još jedna metoda za pravljenje Ag-CNT nanostruktura je jednostavna i efikasna metoda mokre hemije koju su na osnovama reakcije srebrnog ogledala razvili Liu i saradnici [75].

Za pripremu visoko monodispergovanih Ag nanočestica na MWCNT Yang i saradnici [76] su za razliku od uobičajenih metoda koje prave metal/CNT kompozite modifikovanjem CNT, modifikovali Ag nanočestice, molekulima benzil merkaptana ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-SH}$). Funkcionalizacija Ag nanočestica je bila jednostavna i efikasna i odvijala se pod benignim uslovima, kao što su sobna temperatura i bez korišćenja jake kiseline. Uloga korišćenog benzil merkaptana je da sprečava agregaciju Ag nanočestica, da interaguje sa CNT putem $\pi\text{-}\pi$ interakcija čime neće biti narušena struktura CNT i da vezuje Ag nanočestice sa CNTs i vodi njihovoj uniformnoj disperziji na CNTs.

Korišćenjem laserskog zračenja i bez prisustva redukujućeg agensa, Tanaka i saradnici [77] su sintetisali Ag nanočestice/MWCNT kompozite. Ag nanočestice su rasle na

MWCNT laserski indukovanom fotoredukcijom $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Zaključeno je da povećanjem inicijalne koncentracije $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ nastaju čestice većeg prosečnog prečnika.

Za pravljenje Ag nanočesticama dekorisanih nanocevi, Lin i saradnici [78] su koristili metodu termalne dekompozicije bez korišćenja bilo kakvog redukujućeg agensa ili električne struje. Mešanjem u čvrstom stanju soli metala, u konkretnom slučaju srebro acetata, i CNT i grejanjem do temperature dekompozicije soli u inertnoj atmosferi pravili su metal/nanocevi nanohibride. Pokazano je da prosečne veličine nanočestica ne zavise od temperature (dok god je konverzija soli u metal skoro završena), ali da dolazi do njihovog povećanja sa metalnim punjenjem. Ovo ukazuje da postoji relativno konzistentan broj mesta na koje se vezuju nanočestice na površini nanocevi, što čini kontrolu veličine nanočestica mogućom, jednostavnim variranjem nivoa punjenja metalom. Korišćenjem mehaničkog mešanja ili oksidativnog tretiranja kiselinom CNT koje su koristili, dobili su Ag nanočestice redukovane veličine, verovatno zbog povećanog broja vezujućih mesta na površini CNT.

CNT mogu biti funkcionalizovane nanočesticama metala i uz pomoć polimera vezanog za nanocevi. Samo vezivanje polimera na CNT može biti kovalentno i nekovalentno. Nekovalentno vezivanje između polimera i nanocevi podrazumeva fizičku adsorpciju i obmotavanje polimernih molekula posredstvom van der Waals-ovih i π - π interakcija. Kovalentna funkcionalizacija nanocevi polimerom podrazumeva različite tehnike koje mogu biti grupisane kao "kalemljenje na" i "kalemljenje od" [79, 80]. Pristup "kalemljenje na" uključuje vezivanje već pripremljenih ili komercijalno dostupnih makromolekula na zidove i krajeve nanocevi, amidacijom, esterifikacijom ili drugim reakcijama, a praćeno uklanjanjem neizreagovanih polimera filtracijom ili centrifugiranjem. Preduslov je da makromolekuli moraju posedovati odgovarajuće reaktivne funkcionalne grupe ili radikale. Nasuprot ovom pristupu, "kalemljenje od" podrazumeva rast polimera sa površina CNT in situ polimerizacijom monomera u prisustvu reaktivnih CNT ili CNT podržanih makroinicijatora [68]. Ove tehnike su efikasne za modifikaciju površine CNTs čineći ih rastvorljivim u vodenim i organskim rastvaračima. Iako ove tehnike uključuju i tretman kiselinom i višestepene procese organske sinteze i kao rezultat daju male količine

uzoraka, pokazalo se da je funkcionalizacija CNT nanočesticama metala a uz pomoć kovalentno vezanog polimera dokazana kao efikasna metoda [81, 82, 83].

I.1.4.1. Korišćenje γ -zračenja za funkcionalizaciju ugljeničnih nanocevi

Korišćenje γ -zračenja je značajno za razvoj novih funkcionalizovanih materijala. Kada govorimo o polimerima γ -zračenje se može primeniti za iniciranje polimerizacije, kalemljenje polimernih lanaca, modifikovanje mešavina polimera i umrežavanje polimera [84 - 87]. γ -zračenje stvara slobodne radikale putem radiolize monomera a može i da proizvede radikale na polimernim površinama. Uopšteno gledano, reakcije indukovane γ -zračenjem pokazuju sledeće prednosti: produkti reakcija su oslobođeni zaostalih inicijatora ili katalizatora i reakcije mogu da se odvijaju na niskim temperaturama, u gasnoj, tečnoj, pa čak i čvrstoj fazi. Povrh toga, γ -zračenje predstavlja efikasnu i jednostavnu metodu za površinske modifikacije organskih i neorganskih materijala.

Metoda gama zračenja je posebno pogodna za dobijanje metalnih čestica u rastvoru. Radiolitički dobijene vrste, hidratizani elektroni, primarni i sekundarni radikali nastali radiolizom vodenih rastvora imaju sposobnost redukcije metalnih jona. Atomi nastali redukcionim reakcijama su homogeno distribuirani u rastvoru i teže da se sjedine u oligomere koji progresivno rastu u veće klustere. Kontrola veličine čestica se najčešće postiže korišćenjem ograničavajućih agenasa kao što su polimeri, koji su prisutni u rastvoru tokom formiranja metalnih klastera [88]. Funkcionalne grupe koje imaju velik afinitet prema metalima obezbeđuju vezivanje molekula na površinu klastera dok polimerni lanac štiti klaster od daljeg rasta putem elektrostatičkog odbijanja ili sternih smetnji. Konačna veličina sintetisanih klastera zavisi od mnogo faktora, među kojima su tip polimera ili liganda, odnosa metal/polimer, vremena i brzine apsorbirane doze zračenja [89].

Pokazano je da korišćenje γ -zračenja za sintezu nanočestica metala ima brojne povoljne osobine: (1) kontrolisana redukcija metalnih jona može se odvijati bez upotrebe viška redukujućeg agensa ili nastanka nekog neželjenog produkta, (2) brzine reakcija iniciranih zračenjem su dobro definisane i (3) redukujući agens se uniformno stvara u rastvoru [90].

γ -zračenje se uspešno koristi i za redukciju metalnih jona srebra i pravljenje Ag nanočestica. Choi i saradnici [91] su sintetisali nanočestice koloidnog srebra γ -zračenjem rastvora srebra nitrata (AgNO_3) u prisustvu polimera PVP kao stabilizatora. Kumar i saradnici [92] su uspešno radiolitički formirali Ag klaster u vodenom rastvoru poli(vinil alkohola) (PVA) i PVA hidrogelu. Liu i saradnici [93] su pokazali zavisnost prečnika Ag nanočestica dobijenih γ -zračenjem rastvora AgNO_3 , natrijum citrata i etanola, od doze γ -zračenja. Povećanjem doze γ -zračenja od 60 do 530 Gy vrednosti prečnika nanočestica kontinuirano opadaju kao rezultat fragmentacije Ag nanočestica indukovane zračenjem. Pri konstantnoj dozi γ -zračenja od 100 Gy, dobijene nanočestice su imale prečnike visoke reproducibilnosti. Ukazuju da je radiolitički metod sinteze Ag nanočestica metod koji obećava kada je potrebno dobiti "čiste" metalne površine.

Korišćenje γ -zračenja kao metode za funkcionalizaciju CNT srebrom se pokazalo efikasnim [70, 94].

U svom radu Oh i saradnici [70] opisuju pravljenje disperzija Ag nanočestica u PVP korišćenjem γ -zračenjem indukovane redukcije metalnih jona na sobnoj temperaturi. Dobili su dispergovane nanočestice veličine oko 25 nm. Pored toga, uniformno su dispergovali nanočestice Ag na SWCNT korišćenjem γ -zračenja na sobnoj temperaturi. Pokazali su da određeni deo Ag nanočestica ostaje nakačen na SWCNT i nakon ispiranja dihloretanom i tretiranja u ultrazvučnom kupatilu. Razlog vezivanja Ag nanočestica na površinu SWCNT nalaze u modifikaciji površine SWCNT pod dejstvom γ -zračenja, odnosno u stvaranju hidrofилnog okruženja nakon γ -zračenja.

Wu i saradnici [94] u svom radu opisuju metodu funkcionalizacije MWCNT, Ag nanočesticama, korišćenjem γ -zračenja i polimera PVA i dva njegova derivata, poli(vinil-aceton), PVKA, sa stepenom ketalizacije $D_H = 0,22$ i $0,53$. Njihova metoda je kao rezultat dala uspešno Ag/polimerom dekorisane nanocevi, pri čemu su Ag nanočestice raspoređene uniformno duž nanocevi, a struktura MWCNT je ostala očuvana. Pokazali su da polimer igra bitnu ulogu u procesu kačenja Ag nanočestica na MWCNT i da zavisno od korišćenog polimera varira veličina Ag čestica. Kada je korišćen više ketalizovani PVA (odnosno PVKA većeg stepena ketalizacije), dobijene su Ag čestice nešto većih prečnika. Kontrolni eksperimenti koje su radili bez polimera kao rezultat su dali nehomogeno pokrivanje

nanocevi većim Ag česticama koje su imale težnju da stvaraju aglomerate sa drugim Ag česticama i dosta MWCNT čija površina uopšte nije imala Ag čestice na sebi.

I.1.5. Primena ugljeničnih nanocevi

Od svog otkrića do danas, ugljenične nanocevi su od materijala iz snova postale materijal "stvarnog sveta" [95], koji danas zauzima veoma važno mesto u nauci. Zahvaljujući izuzetnim elektronskim i strukturnim osobinama (metali ili poluprovodnici, kvantni efekti povezani sa njihovim nanodimenzijama), izuzetnim optičkim, termalnim i spektroskopskim osobinama, ugljenične nanocevi predstavljaju ogroman potencijal i stoga nalaze i širok spektar primena. Broj i raznolikost radova koji se bave primenom CNT je neverovatno velik. U ovom poglavlju će biti dat kratak pregled nekih od najznačajnijih oblasti primene CNT.

Primena ugljeničnih nanocevi u biotehnologiji doživljava stalni razvoj sa potencijalnom primenom koja ide od senzora, skafolda (skela) u inženjeringu tkiva, do prenosa lekova. Kao što je već rečeno, ove oblasti se razvijaju paralelno sa funkcionalizacijom CNT, neophodnom za poboljšanje rastvorljivosti i biokompatibilnosti nanocevi. Značajna je primena CNT za projektovanje i razvoj lekova [96], terapiju karcinoma [97], razvoj biosenzora [98], prenos lekova i biomolekula [99].

Zahvaljujući sposobnosti da prodiru u ćeliju, CNT su značajne za izučavanje potencijalnih primena u prenosu lekova, hemoterapeutika, peptida, proteina, nukleinskih kiselina, vakcina.

Razvoj sistema prenosa koji će gađati i biti internalizovani od strane specifičnih ćelija tumora bez sekundarnih posledica i toksičnih efekata na zdrava tkiva je veliki izazov u tretiranju karcinoma. CNT mogu biti korišćene kao osnova za višestruku derivatizaciju punjenjem njihove površine terapeutskim agensima (za lečenje), fluorescentnim, magnetnim ili radionuklidnim sondama (za praćenje) i aktivnim grupama (za ciljanje određene mete u organizmu) [100].

Proučavan je prenos kompleksa platine (IV), odnosno kovalentno vezivanje ovog kompleksa i SWCNT i prenos u ćeliju. U ćeliji dolazi do oslobađanja toksične antikancerogene cisplatine redukcijom Pt^{4+} na malim pH vrednostima. Pokazano je da je efikasnost prenosa bila 6 do 8 puta veća nego za samu cisplatinu [101]. Antikancerogeni lek doxorubicin (DOX) je konjugovan sa SWNT kovalentnim i nekovalentnim vezivanjem i pokazano je da je kapacitet punjenja nanocevi kao prenosnika mnogo bolji nego lipozoma, odnosno najboljih prenosnih sistema lekova. Potvrđeno je da MWCNT mogu da formiraju supramolekulske komplekse sa doxorubicinom i povećaju njegovu citotoksičnu aktivnost [102]. Takođe je pokazano da CNT mogu da vrše prenos nukleinskih kiselina specifičnih za terapiju karcinoma. U radu Zhang-a i koautora [103] ilustrovano je korišćenje CNT kao prenosnih sistema za siRNA. Za posredovanje u prenosu TERT siRNA u ćelije tumora (glodara i humane) korišćene su CNT-NH₃⁺. Uočeno je da je tretiranje različitih ćelija tumora sa CNT:TERT siRNA kompleksima vodilo supresiji ćelijskog rasta. Postoje nagoveštaji i o potencijalnoj primeni CNT za lečenje HIV-a [104].

Istražuju se mehanizmi selektivnog gađanja tumora biofunkcionalizovanim CNT zahvaljujući njihovoj sposobnosti da pretvaraju NIR lasersko zračenje u toplotu. Ovo svojstvo otvara put za razvoj novih imunokonjugata za fototerapiju karcinoma sa dobrim performansama i efikasnošću u selektivnoj termalnoj ablaciji malignih ćelija [105]. Metod se zasniva na intracitoplazmatskoj internalizaciji i pravljenju klastera CNT i njihovoj intenzivnoj optičkoj apsorpciji pod uticajem NIR laserskog zračenja gde biološki sistemi imaju nisku apsorpciju i visoku transparentiju. Optoelektronski prelazi u grafitnim strukturama klastera CNT proizvode termalnu energiju [106] koja brzo difunduje u različite odeljke ćelije, gde su CNT prisutne i za posledicu ima ćelijsku smrt [107].

Obzirom na sposobnost CNT da prodiru u ćeliju, postavlja se pitanje o sudbini CNT kada se nađu u ćeliji. U svom radu Strano i saradnici [108] su pokazali da dolazi do egzocitoze SWCNT, pri čemu navode da egzocitoza i endocitoza imaju skoro istu brzinu.

Utvrđeno je da se adsorbovanjem gadolinijum (III) kompleksa na MWCNT može dobiti efikasan kontrast za magnetnu rezonancu [109].

Još jedna od primena na polju medicine je potencijalna primena polimera punjenih nanocevima koja je izučavana sa ciljem pravljenja mikrokatetera [110]. CNTs homogeno

dispergovane u najlon polimeru omogućuju da mikrokateri imaju spoljne dijemetre malih dimenzija (0,53mm), dva puta veću mehaničku snagu i veoma smanjenu koagulabilnost u poređenju sa čisto polimernim mikrokaterom. Stabilni biološki odgovori mikrokatera punjenih nanocevima potvrđeni su histopatološki.

Značajno je pomenuti i ulogu CNT u regenerativnoj medicini. Naime, električno neutralne CNT se mogu smatrati potencijalnim puniocima za lečenje povredene kosti. Pokazano je da osteoblasti (ćelije odgovorne za formiranje kostiju) rastu i proizvode mineralizovanu kost, kada se uzgajaju na neutralnim CNT. Ovim održavanjem rasta osteoblasta i formiranjem kostiju, CNT predstavljaju potencijalni tehnološki napredak u oblasti bioinženjeringa kostiju [111].

Pored biomedicine, kao jedne od najznačajnijih oblasti proučavanja i primene, CNT imaju potencijalnu primenu i kao provodni punioci u polimernim nanokompozitima [112], kao senzori, tranzistori, anodni materijali za litijum-jonske baterije, kao elektrode za superkondenzatore i mnoge druge.

CNT se mogu koristiti i kao tipovi za skenirajuću mikroskopiju [113]. Pojedinačne nanocevi dužine nekoliko mikrometara su zakačene na silicijumske centilevere (konzole) konvencionalnog AFM-a (mikroskop atomskih sila). Zahvaljujući fleksibilnosti nanocevi, tipovi i površina uzorka su otporni na oštećenja. Korišćenjem nanocevi za skenirajuću tunelsku mikroskopiju (STM), iskorišćena je njihova električna provodljivost.

Funkcionalizacijom pamučnih vlakana ugljeničnim nanocevima, odnosno pravljenjem mreže CNT na površini pamučnih vlakana, zahvaljujući pojačanju i zaštiti CNT, pamučni materijali pokazuju poboljšana mehanička svojstva, otpornost na plamen, poboljšanu sposobnost blokade UV zračenja i odlična hidrofobna svojstva. Tekstili obloženi CNT će imati brojne primene u razvoju tekstila za zdravstvo, sport, vojsku i modu, a uzimajući u obzir izuzetne elektronske osobine CNT, ovako funkcionalizovana pamučna vlakna će pronaći mnoštvo primena za proizvodnju tkanina visokih performansi i pametnih tekstila [114].

I.1.5.1. Primena CNT funkcionalizovanih srebrom

Poznato je da srebro ima širok antibakterijski spektar, a nanočestičnost podrazumeva veću dodirnu površinu u kontaktu sa ćelijama bakterija i stoga bolju interakciju od većih čestica. Nanočestice kao što su nanočestice srebra, srebro bromida, zink oksida, titanium dioksida i bakar oksida ulivene u sintetičke polimere kao što su najlon i polipropilen mogu da imaju antimikrobni karakter. Mogući mehanizmi delovanja Ag nanočestica su da nanočestice mogu da se vežu na ćelijsku membranu i oštete je, prodru u bakteriju i oštete DNK ili napadnu respiratorni lanac, i u svakom slučaju dovedu do ćelijske smrti. Nanočestice oslobađaju srebrne jone unutar bakterijske ćelije, čime se poboljšava njihovo baktericidno dejstvo [115]. Izuzetna toksičnost jona srebra i jedinjenja na bazi srebra prema mikroorganizmima, sa jakim inhibitornim efektima na čak 16 vrsta bakterija, dovela je do toga da se nanočestice srebra mnogo ispituju [116, 117].

Primena CNT u smislu pojačivača kod polimernih kompozita, a zbog njihove izuzetne mehaničke snage, nanometarskog prečnika i velikog odnosa dužine i prečnika, raste iz dana u dan. Što se tiče toksičnosti CNT prema bakterijama, u svom radu Kang i saradnici tvrde da SWCNT pokazuju veću toksičnost prema bakterijama nego MWCNT [118]. Ćelijska membrana bakterije biva oštećena direktnim kontaktom sa SWNT agregatima, što vodi smrti bakterijske ćelije. Pokazano je da MWCNT imaju relativno malu antimikrobnu aktivnost u poređenju sa SWCNT. Veća površina MWCNT može da se koristi kao supstrat za pripremanje hibridnih kompozita sa Ag nanočesticama i time poboljša antibakterijski efekat MWCNT [119].

Kompoziti koji sadrže nanočestice plemenitih metala i CNT, gde su nanočestice vezane na površinu CNT, imaju potencijalnu primenu u biomedicini, sensorima i heterogenoj katalizi [120]. Ag dekorisane CNT (Ag/CNT) privlače pažnju zbog potencijalne primene kao katalizatora [76, 121], naprednih materijala [122, 123], senzora za gas [124], provodnih punilaca [125], gradivnih blokova integrisanih kola [126], antimikrobnih agenasa.

Ispitivanjem antimikrobne filtracije vazduha [127], deponovanjem Ag/CNT hibridnih nanočestica na filtere za prečišćavanje vazduha, utvrđeno je da su filteri sa

deponovanim Ag/CNT pokazali poboljšanu antimikrobnu aktivnost u odnosu na filtere sa deponovanin CNT ili Ag nanočesticama. U svom radu, Mohan i saradnici tvrde da je dodirna površina Ag nanočestica povećana zahvaljujući nanocevima, što je jedan od razloga za veću antimikrobnu efikasnost filtracije Ag/CNT u poređenju sa onom koju imaju same Ag nanočestice [128].

Najlon-6/Ag/CNT hibrid polimerna nanokompozitna vlakna imaju značajnu antimikrobnu aktivnost u dejstvu protiv različitih sojeva bakterija, kao što su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* [129].

I.1.6. Toksičnost ugljeničnih nanocevi

Za CNT, kao i za svaki drugi terapijski ili dijagnostički agens, rizik od toksičnih neželjenih efekata mora se procenjivati u odnosu na potencijalne prednosti koje ovi novi materijali imaju. Postoji mnogo radova koji se bave ispitivanjem toksičnosti CNT, ali rezultati često nisu u međusobnoj saglasnosti. Tako nailazimo na kontradikcije u istraživanjima, gde neka tvrde da prečišćene CNT nisu toksične, a druga da prerađene CNT pokazuju veću toksičnost [130, 131].

Studije *in vitro* i *in vivo* citotoksičnosti CNT su uglavnom skoncentrisane na efekat nečistoća metalnog katalizatora, dužinu i tip nanocevi i različite hemikalije korišćene za površinsku funkcionalizaciju i disperziju CNT. Metalni katalizatori se smatraju jednim od glavnih izvora citotoksičnosti CNT [132]. Gvožđe, najčešći katalizator za rast CNT, može pojačati reakcije slobodnih radikala u živim ćelijama [133].

Ispitivanjem uticaja dužine nanocevi na njihovu citotoksičnost, Sato i saradnici [134] su utvrdili sličnu blagu citotoksičnost *in vitro*, za MWCNT dužine 220 i 825 nm. Ispitivanjima potkožnog tkiva pacova *in vivo* pokazali su da je inflamatorni odgovor izraženiji za CNT dužine 825 nm nego za CNT dužine 220 nm, jer je za makrofage mnogo lakše da obuhvate CNT dužine 220 nm. I pored toga ni za jedne od ispitivanih nanocevi nije uočen ozbiljan inflamatorni odgovor, kao što su nekroza ili degeneracija.

U istraživanjima Donaldson-a i saradnika [135] nefunkcionalizovane MWCNT različitih dužina dispergovane su u fiziološkom rastvoru i ubrizgane u miša intraperitonealno. Akumulacija MWCNT u mezotelijumu i odgovarajući stepen formiranja granulomatoznih lezija bili su značajno veći nakon ubrizgavanja rigidnih MWCNT dužih od 20 μm , u poređenju sa kraćim zamršenim agregatima nanocevi. Ovo ukazuje na povećani rizik izlaganja pluća dugim i krutim CNT, verovatno zbog toga što makrofagi ne mogu potpuno da progutaju duga vlakna. Iako ova studija ne daje procenu da li granulomatozne lezije dovode do formiranja tumora, uočeno je da simptomi koji potiču od izlaganja dugim MWCNT liče na one koji se ispoljavaju kod životinja u koje je ubrizgan azbest, korišćen kao pozitivna kontrola.

Različiti tipovi CNT, kao što su SWCNT i MWCNT mogu imati različite nanotoksikološke efekte zbog njihove promenljive dodirne površine [136]. SWCNT imaju veliku dodirnu površinu, ali i veću sklonost ka agregaciji u svežnjeve zbog jačih van der Waals-ovih sila, što uzrokuje redukovanu površinu. Agregacija CNT je štetna za žive ćelije, organe i tkiva [137]. Duž bočnih zidova MWCNT postoji mnogo aktivnih defekata koji pomažu u tome da se njihova agregacija izbegne. Smatra se da su MWCNT manje toksične od SWCNT. Međutim, teško je napraviti pravo poređenje citotoksičnosti SWCNT i MWCNT jer nije jasno da li bi nanotoksičnost trebalo da se odnosi na istu masenu koncentraciju ili istu ukupnu površinu CNT [138]. Za poboljšanje biokompatibilnosti CNT površinska hemija igra značajnu ulogu. Pokazano je da visokim stepenom funkcionalizacije bočnih zidova CNT dolazi do značajne redukcije citotoksičnosti [139, 140]. Stepenu u kom su CNT dispergovane, a što je povezano sa disperzionim agensom koji se koristi, takođe utiče na citotoksičnost. Osim pomenutih faktora, doze CNT, tipovi ćelija i metode korišćene za testove citotoksičnosti takođe utiču na rezultate. Dakle, neophodno je razmotriti interakcije između svih faktora kada se želi doći do pouzdanog protokola za *in vitro* ili *in vivo* utvrđivanje citotoksičnosti [99].

Zaključak koji se može izvesti pregledom literature o toksičnosti CNT je da je pokazana citotoksičnost sirovih (tek proizvedenih) CNT za različite ćelije sisara *in vitro* i za kožu i pluća *in vivo*. Osobina ovakvih CNT da se grupišu u svežnjeve, ide u prilog objašnjenju njihove citotoksičnosti. Duge i rigidne nanocevi bi trebalo izbegavati za *in vivo*

primene. U smanjivanju citotoksičnosti ključnu ulogu igra funkcionalizacija nanocevi koju je potrebno optimizovati da obezbedi adekvatnu disperzibilnost, individualizaciju i brzinu izlučivanja dovoljne da spreče nagomilavanje u tkivima. CNT koje imaju homogenu raspodelu dužine, prečnika i hiralnosti su one koje bi trebalo izučavati za primene u biomedicini. Potrebno je napraviti određenu standardizaciju CNT, testova, ćelija/organizama prilikom izučavanja toksičnosti i vršiti dalja sistematičnija *in vitro* i *in vivo* ispitivanja korišćenjem biološki kompatibilnih CNT da bi se napravio njihov generalni toksikološki profil.

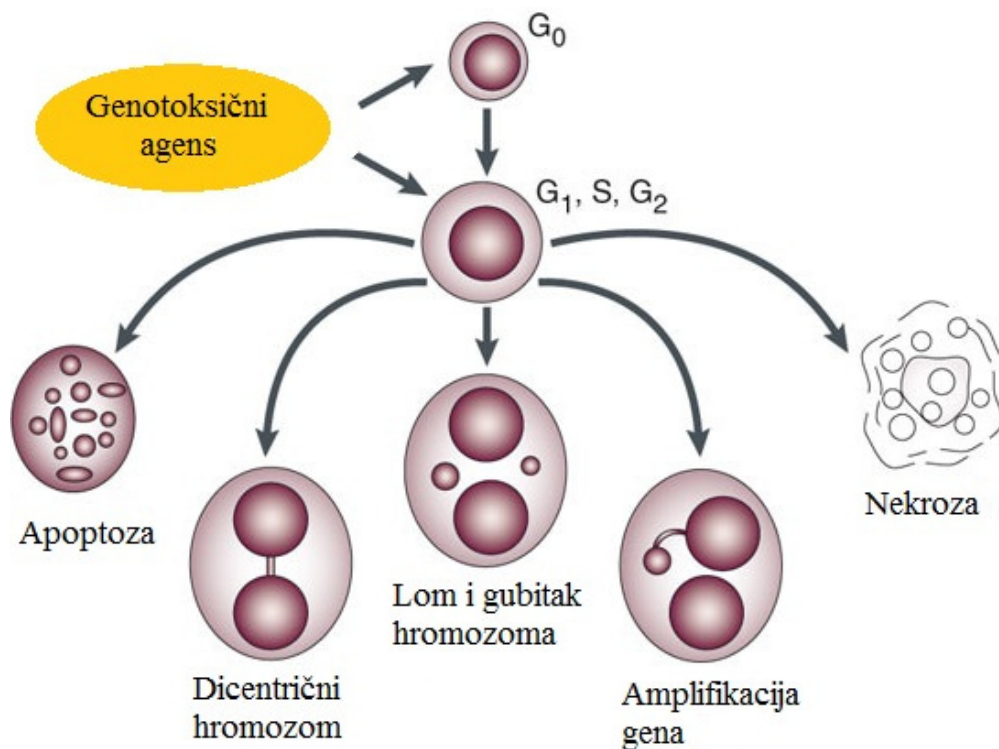
I.2. Biomonitoring genotoksičnosti i citotoksičnosti

I.2.1. CBMN test

Mikronukleusi (MN) i druge anomalije ćelijskog jedra kao što su nukleoplazmatični mostovi (nucleoplasmic bridges - NPBs) i pupljenje jedra (nuclear buds - NBUDs) predstavljaju biomarkere hromozomskog oštećenja i genomske stabilnosti. U biomonitoringu genotoksičnosti i citotoksičnosti *in vivo* i *in vitro* značajnu ulogu ima CBMN (Citokinesis-Block Micronucleus) test, koji omogućuje praćenje i merenje ovih oštećenja [141]. Ćelije koje su pretrpele oštećenje DNK posle jedne deobe odgovaraju pojavom mikronukleusa. Mikronukleusi su samostalne ekstranukleusne strukture u citoplazmi, potpuno odvojene od jedra, izgleda malih jedara, koji potiču od fragmenata hromozoma ili celih hromozoma koji zaostaju nakon završene anafaze, a po završetku deobe ne ulaze u sastav nukleusa [142]. U CBMN testu oštećenja DNK se uočavaju u ćelijama koje su prošle kroz jednu ćelijsku deobu (binukleusne ćelije). Iz tog razloga neophodno je sprečiti citokinezu, odnosno deobu citoplazme, što se postiže dodavanjem citohalazina B dok se deoba jedra odvija neometano.

Nukleoplazmatični mostovi u binukleusnim ćelijama, biomarkeri reuređenja hromozoma, su još jedno merilo za procenu genotoksičnog efekta. Oni su kontinuirana veza između jedara u binukleusnoj ćeliji i nastaju kao posledica premeštanja centromera dicentričnog hromozoma na suprotne polove ćelije tokom anafaze. Pri nastanku ćerki ćelija i podeli citoplazme dolazi do cepanja ovih mostova ali se blokiranjem citokineze omogućuje zadržavanje NPBs između jedara. Širina NPBs varira ali najčešće nije veća od četvrtine prečnika jedra ćelije. Retko se dešava da dođe do formiranja više od jednog NPB unutar jedne binukleusne ćelije, a ćelije sa NPB često sadrže jedan ili više mikronukleusa [141]. NPB su potvrđeni kao biomarker DNK oštećenja [142].

Pupljenje jedra, što je biomarker amplifikacije gena, je još jedna anomalija jedra povezana sa hromozomskom nestabilnošću. U *in vitro* eksperimentima sa ćelijama sisara [143] pokazano je da je amplifikovana DNK selektivno lokalizovana na određenim mestima na periferiji jedra i da biva eliminisana putem pupljenja jedra tokom S faze ćelijskog ciklusa. Ove anomalije jedra imaju istu morfologiju kao mikronukleusi, sa izuzetkom što su povezani za jedro nukleoplazmatičnim materijalom [144].



Slika 10. Različite moguće sudbine CBMN ćelijskih kultura nakon izlaganja citotoksičnim/genotoksičnim agensima. Korišćenjem ovih biomarkera u okviru CBMN testa, moguće je meriti frekvenciju hromozomskih prekida (MN), gubitka hromozoma (MN), rearanžmana genetičkog materijala između hromozoma, (na primer, dicentrični hromozomi se u binukleusnim ćelijama prepoznaju po međuredarnim mostovima - NPB), amplifikaciju gena (NBUDs), nekrozu i apoptozu [145]. Slika preuzeta i adaptirana sa dozvolom iz Nature Protocols, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, autora Michael Fenech, 2, 1084. Copyright (2007) Nature Publishing Group.

CBMN testom se može utvrditi ukupan broj MN, ukupni broj ćelija sa MN, raspodela MN u ćelijama, broj NPBs i NBUDs, broj ćelija u apoptozi (programirana ćelijska smrt) i nekrozi (prerana ćelijska smrt) i indeks proliferacije ćelija u uslovima *in vitro*. Uključivanje biomarkera oštećenja hromozoma u CBMN test, zajedno sa MN, nekrotičnim i apoptotičnim ćelijama omogućuje merenje komplementarnih genotoksičnih i

citotoksičnih uticaja. Ova sveobuhvatna procena toksičnosti korišćenjem CBMN testa je ilustrovana na slici 10.

I.2.2. Dvolančani prekidi DNK

Dvolančani prekid DNK (DNA double-strand break - DSB) je vrsta oštećenja DNK gde dva komplementarna lanca dvostrukog heliksa DNK bivaju istovremeno prekinuta, jedan naspram drugog. Dvolančani prekid se smatra najopasnijom vrstom oštećenja DNK jer je jedan nepopravljeni DSB dovoljan da indukuje proces ćelijske smrti [146]. Faktori koji dovode do nastanka dvolančanih prekida uključuju endogene faktore, koji su povezani sa fiziološkim procesima koji se odvijaju u ćeliji i egzogene faktore, kao što su npr. jonizujuće zračenje i antikancerogeni lekovi [147, 148].

Kao odgovor na formiranje dvolančanih prekida u ćelijama sisara aktivira se mehanizam popravke oštećene DNK. Inicijacija popravke počinje fosforilacijom histona H2AX, na mestu Ser139. Na taj način jedan gradivni protein histon H2 postaje signali molekul za aktiviranje kaskade enzima potrebnih da se nastalo oštećenje popravi. Fosforilisana forma H2AX se naziva γ -H2AX [149].

Nepopravljeni dvolančani prekidi indukuju genomsku nestabilnost i stoga ćelije imaju mehanizme odgovorne za prepoznavanje DNK oštećenja i u odgovoru na indukovano oštećenje aktiviraju puteve koji vode popravci DNK. Na mestima dvolančanih prekida, kao odgovor na indukovano oštećenje, dolazi od relokalizacije proteina i njihove interakcije sa γ -H2AX. Pretpostavlja se da γ -H2AX fokusi posebno privlače ove faktore popravke što vodi većim koncentracijama proteina odgovornih za popravku oko mesta dvolančanih prekida [150]. Tako γ -H2AX ima značajnu ulogu kao vezujuće mesto za proteinske komplekse koji se dalje grupišu na mestima dvolančanih prekida DNK i utiču na remodelovanje hromatina sa ciljem sprečavanja razdvajanja krajeva DNK. [151].

Kvantitativno određivanje dvolančanih prekida je prvobitno bilo bazirano na metodama kao što su elektroforeza u pulsnom polju i komet testu (single cell gel electrophoresis). Razvojem antitela specifičnog za γ -H2AX, omogućena je detekcija H2AX fosforilacije i na taj način imunocitohemijska detekcija DNK oštećenja i popravke *in situ* u

pojedinačnim ćelijama. Prisustvo γ H2AX u hromatinu može biti detektovano brzo nakon indukovanja dvolančanih prekida u formi izolovanih nukleusnih fokusa. Obzirom da svaki fokus predstavlja jedan dvolančani prekid, njihova učestalost govori o učestalosti dvolančanih prekida. U poređenju sa alternativnim metodama procene DNK oštećenja koje su pomenute, ovaj, imunocitohemijski pristup je jednostavniji i ima znatno veću osetljivost [152]. Prisustvo γ -H2AX fokusa može se meriti mikroskopijom i protočnom citometrijom.

Osim fundamentalnog značaja kao osetljivog markera za odgovor DNK na oštećenja i proces popravke DNK, određivanje nivoa γ -H2AX ima praktične primene u praćenju efekata antikancer terapije, proceni tumor rizika, kao i određivanju efekata zagađivača životne sredine na DNK [153].

II CILJ RADA

Postavljena su tri osnovna pravca istraživanja u ovom radu: prečišćavanje CNT, njihova funkcionalizacija i ispitivanje genotoksičnosti.

Prvi deo rada se odnosi na prečišćavanje CNT, korišćenjem dve različite metode, sa ciljem utvrđivanja prednosti jednostepene metode prečišćavanja korišćenjem polimera PmPV. Ispitivanje prečišćavanja CNT u ovom radu predstavlja preliminarna istraživanja.

Drugi deo se odnosi na funkcionalizaciju CNT klasterima srebra. Za sintezu kompozita Ag/CNT primenjena je nova i efikasna metoda korišćenjem gama zračenja. Osim same funkcionalizacije cilj je ispitivanje potencijala različitih hemijskih puteva funkcionalizacije i redukcionih sposobnosti različitih redukujućih vrsta nastalih gama zračenjem. Nakon funkcionalizacije CNT klasterima srebra, cilj je ispitivanje veličine i stabilnosti ovih klastera.

Treći deo je ispitivanje genotoksičnosti ugljeničnih nanocevi, nefunkcionalizovanih i funkcionalizovanih. Genotoksičnost je ispitivana korišćenjem dva testa: citokinezis-blok mikronukleus (CBMN) i γ -H2AX testa i dve vrste ćelija čoveka: limfocita periferene krvi i fibroblasta kože. Indukcija MN i proliferativni potencijal ispitivani su na limfocitima, dok su dvolančani prekidi DNK ispitivani na fibroblastima.

III EKSPERIMENTALNI DEO

III.1. Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi

Kao sirovi, polazni materijal koji je prečišćavan korišćen je ugljenični materijal MER korporacije (Materials and Electrochemical Research Corporation (Tucson, Arizona)), dobijen metodom lučnog pražnjenja bez korišćenja katalizatora, koji je sadržavao 20-40% MWCNT i druge tipove ugljeničnih čestica (kao što je amorfni ugljenik). Navedene nanocevi sadrže 8-30 grafenskih slojeva, prečnika su 6-20 nm i 1-5 μm dužine.

Ovaj materijal je prečišćavan sledećim postupkom. Proces prečišćavanja je započet žarenjem. Smeša sirovog materijala (neprečišćenih nanocevi) je žarena na 480°C na vazduhu jedan sat. Gubitak mase je bio beznačajan. Temperatura je podignuta na 600°C naredna tri sata i gubitak mase je bio 10,2 %. Potom je materijal podeljen na dva dela.

Prvi deo je tretiran 12M HCl (15 mg materijala dobijenog žarenjem na 1 ml kiseline). Smeša je mešana na magnetnoj mešalici kratko vreme i ostavljena da stoji 24 sata, uz povremeno mešanje. Kasnije je centrifugirana i ispirana vodom nekoliko puta do blago kisele reakcije, sušena na vazduhu i merena.

Drugi deo materijala koji je odvojen tretiran je 6M HCl (15 mg materijala na 1 ml kiseline) u ultrazvučnom kupatilu dva sata. Nakon toga je centrifugiran i ispiran vodom nekoliko puta i sušen na vazduhu.

Jednostepena metoda prečišćavanja polimerom je primenjena na isti sirovi materijal sa ciljem "mekšeg" nedestruktivnog prečišćavanja sa većim prinosom. Princip je da se nanocevi disperguju u odgovarajućem organskom polimernom rastvoru. Rastvor PmPV [154] u toluenu je korišćen u ovom eksperimentu.

Odnosi masa polimera i ugljeničnih nanocevi pri kojima će doći do zasićenja CNT u suspenziji u velikoj meri zavise od čistoće nanocevi [155]. Odmereno je 12,5 ml rastvora PmPV u toluenu koncentracije 18 g/l i pomešano sa 0,0840 g sirovog materijala. Smeša je

mešana kratko vreme i tretirana u ultrazvučnom kupatilu dva sata a potom ostavljena da stoji 48 sati. Izdvojila su se tri sloja. Donji sloj se sastoji od crnih ugljeničnih nečistoća koje su se nataložile. Srednji sloj, zeleno-crna suspenzija, sastoji se od nanocevi i polimera. Gornji sloj je bistri žuti rastvor zaostalog polimera u rastvaraču, koji ukazuje da nije došlo do zasićenja nanocevi u polimeru, već da je manje koncentrovani polimerni rastvor mogao biti korišćen.

Srednji sloj, zeleno-žuta suspenzija, je odvojen od donjeg crnog sloja ugljeničnih nečistoća. Za odvajanje nanocevi od polimera bilo je potrebno oslabiti van der Waals-ove interakcije između heksagona ugljenika u nanocevima i benzenovih prstena PmPV-a. Da bi ovo bilo postignuto, suspenzija je razblažena toluenom (10 ml suspenzije sa 250 ml toluena). Nanocevi su izdvojene iz razblaženog PmPV rastvora korišćenjem Bihner-ove filtracije. Za filtriranje nanocevi iz polimernog rastvora korišćen je poli(tetrafluoroetilen) (PTFE) na polietilen Millipore FGLP filteru sa prečnikom pora od 0,2 μm . Nanocevi su ostale na filteru kao crni ostatak, dok je filtrat bio svetlo žut, što je ukazivalo na prisustvo PmPV-a ali ne i nanocevi. Nanocevi na filteru su isprane toluenom nekoliko puta, dok filtrat nije postao bezbojan a što ukazuje na odsustvo PmPV-a. Filter je ostavljen da stoji na vazduhu da toluen ispari, a zatim je meren. Gubitak mase u odnosu na polaznu masu sirovog materijala je oko 90%. Nanocevi su se zalepile za filter te ih je bilo teško sastrugati. U pokušaju odvajanja nanocevi od filtera kratkim potapanjem u toluen i izlaganjem ultrazvuku, došlo je do delimičnog rastvaranja filtera.

Za karakterizaciju neprečišćenih i prečišćenih MWCNT korišćen je skenirajući elektronski mikroskop SEM (JEOL JSM 6460 LV Japan, 2003) [156].

III.2. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi klasterima srebra

Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi (SWCNT i MWCNT) klasterima srebra vršena je naprednom, jednostavnom i efikasnom jednostepenom metodom, korišćenjem γ -zračenja. Vezivanjem polimera (poli(vinil alkohol) – PVA) na površinu CNT i simultanom

redukcijom Ag^+ jona pod dejstvom γ -zračenja dolazi do nastanka klastera srebra koji funkcionalizuju CNT. PVA je uspešno korišćen za redukciju jona srebra, bez korišćenja bilo kog drugog redukujućeg agensa za dobijanje Ag nanočestica na CNT. Ispitivan je potencijal dva različita hemijska puta sinteze i redukciona sposobnost različitih redukcionih vrsta nastalih γ -zračenjem. Optičke osobine dobijenih uzoraka i mehanizam odgovoran za funkcionalizaciju CNT su ispitivani UV-Vis i FTIR spektroskopijom. Dekorirane nanocevi su vizuelizovane korišćenjem mikroskopskih tehnika transmisione elektronske mikroskopije (TEM) i skenirajuće tunelske mikroskopije (STM). Prisustvo Ag na nanocevima potvrđeno je korišćenjem EDX spektroskopije. Karakterizacija klastera srebra koji su funkcionalizovali nanocevi izvršena je MALDI-TOF masenom spektrometrijom. Vršeni su teorijski proračuni stabilnosti klastera srebra i poređeni sa eksperimentalnim rezultatima dobijenim masenospektrometrijski.

III.2.1. Materijal

Sve komercijalne hemikalije su korišćene bez daljeg prečišćavanja. SWCNT (čistoće oko 70%) i MWCNT (čistoće > 99%) su dobijene metodom lučnog pražnjenja i nabavljene su od Sigma-Aldrich-a. PVA (molekulske mase 72000 g/mol i stepena hidrolize 99%) i AgNO_3 su proizvodi Merck-a, a etanol je proizvod Sigma-Aldrich-a. Za pripremu rastvora i ispiranje uzoraka korišćena je dejonizovana voda iz Milli-pore Milli-Q sistema. Korišćeni su Ar i N_2O visokog stepena čistoće (99,5%).

Matriksi za MALDI TOF merenja α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA) i 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina (DHB) su proizvodi Sigma-Aldrich-a.

III.2.2. Sinteza Ag/CNT kompozita

Pripremljena su dva uzorka od po 16 mg SWCNT, 5 ml destilovane vode, 1 ml PVA (0,05 g/ml) i 144 mg AgNO_3 . Smeše su produvavane argonom ili N_2O 30 min u cilju uklanjanja kiseonika i potom izložene dejstvu γ -zračenja (izvor ^{60}Co). Ozračivanje se odvijalo brzinom doze od 10 kGy/h do apsorbovane doze od 55 kGy, što je potrebna doza

za potpunu redukciju Ag^+ jona. Ista procedura je primenjena i za MWCNT [157]. Dobijeni sistemi su nazvani Ag/PVA/SWCNT i Ag/PVA/MWCNT i u daljem tekstu će ovi nazivi biti korišćeni za sisteme Ag funkcionalizovanih nanocevi.

III.2.3. Instrumentalne metode

U cilju određivanja prisustva nanočestičnog srebra u dobijenim sistemima funkcionalizovanih nanocevi korišćena je UV-Vis spektroskopija. UV-Vis apsorpcioni spektri pripremljenih koloidnih rastvora Ag/PVA/SWCNT i Ag/PVA/MWCNT snimani su korišćenjem Thermo Scientific Evolution 600 spektrofotometra u opsegu talasnih dužina od 250 do 850 nm.

Za vizuelizaciju funkcionalizovanih i nefunkcionalizovanih CNT korišćene su mikroskopske tehnike TEM, STM i SEM, pri čemu je u određenim tačkama SEM mikrografa primenjena EDX metoda, u cilju elementarne analize uzoraka.

TEM rezultati su dobijeni korišćenjem JEOL 100CX instrumenta, koji ima radni napon od 100 kV. Uzorci su naneti na bakarne mrežice, ostavljeni da se delimično osuše na vazduhu, potom isprani destilovanom vodom u cilju uklanjanja vodorastvornih soli. Nakon sušenja na vazduhu, pristupljeno je TEM merenju.

Za SEM merenja korišćen je uređaj JEOL SEM JSM 6460 LV Japan. Uzorci su naneti na odgovarajuće "nosače" a potom naparavani slojem aluminijuma debljine 15 nm i gustine $2,69 \text{ g/cm}^3$. Napon ubrzanja je iznosio 30 kV.

STM merenja su urađena na instrumentu Digital Instruments Nanoscope Multi Mode IIIe (VEECO Instruments). Merenja su rađena korišćenjem tipova od volframske žice koji su naoštreni elektrohemijским nagrivanjem. Kontrola tipa je vršena na sveže očišćenom, visoko orijentisanom pirolitičkom grafitu (HOPG). Nefunkcionalizovane i funkcionalizovane CNT su dispergovane u apsolutnom etanolu korišćenjem magnetne mešalice tokom 10 minuta. Kap, dve suspenzije su nanete na površinu HOPG-a i ostavljene da ispari rastvarač. Tunelirajuća struja $I_T = 1,0 \pm 0,1 \text{ nA}$ i napon $U_{SB} = 7,5 \pm 0,5 \text{ mV}$ su bili tipični uslovi. Sve STM slike su snimane u konstantnom strujnom modu. Za obradu STM slika korišćen je Nanoscope 5.31 r1 program.

Strukturna analiza funkcionalizovanih nanocevi je urađena merenjem difrakcije X zraka (XRD) korišćenjem Bruker D8 Advance difraktometra (Cu K α 1 zračenje, $\lambda = 0,1541$ nm).

Infracrveni spektri sintetisanih uzoraka su snimani korišćenjem Thermo Electron Corporation Nicolet 380 FTIR spektrofotometra, u ATR režimu rada.

Masenospektrometrijska merenja su izvršena korišćenjem instrumenta MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometer), firme AB Applied Biosystems, Voyager-DE PRO, USA. Ovo je maseni spektrometar koji za izvor ima MALDI, što podrazumeva matriksom potpomognutu lasersku desorpciju i jonizaciju, i analizator na bazi vremena preleta. Uređaj je opremljen 20 Hz pulsним azotnim laserom sa emisijom na 337 nm i maksimalnom energijom po pulsu 180 μ J. MALDI TOF maseni spektri pozitivnih i negativnih jona snimani su u linearnom i reflektrom modu. Napon ubrzanja u sistemu je bio 20 kV. Primenjen je režim rada sa kašnjenjem ekstrakcije jona, pri čemu je vreme kašnjenja jona iznosilo 150 ns. Svi spektri predstavljaju prosek od najmanje 100 pojedinačnih laserskih snimaka. Kao matriksi su korišćeni α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA) - za rad sa pozitivnim i negativnim jonima i 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB) za rad sa negativnim jonima. Za pripremu rastvora CHCA matriksa 8 mg CHCA matriksa je rastvoreno u 50% acetonitrilu sa dodatkom 0,1% trifluoroacetatne kiseline. Rastvor DHB matriksa je pripremljen rastvaranjem matriksa u 50% acetonitrilu sa dodatkom 0,3% trifluoroacetatne kiseline. Kao uzorci za MALDI TOF analizu korišćeni su uzorci dobijeni funkcionalizacijom CNT klasterima Ag primenom γ -zračenja i uzorak AgNO₃. Uzorci su mešani sa matriksom tako da odnos zapremina uzorak : matriks, koje se nanose na pločicu, bude 1:10. Nakon nanošenja uzorka i matriksa na pločicu, nanete smeše su ostavljene da se suše na vazduhu, nakon čega je pristupljeno analizi. Za analizu dobijenih spektara korišćen je Data Explorer 4.9. Kao materijal za unutrašnju kalibraciju korišćeni su joni CHCA matriksa, na osnovu teoretski izračunatih masa CHCA monomera, dimera i trimera na m/z 190,0499 (molekulska formula C₁₀H₇NO₃), 379,0924 (molekulska formula C₂₀H₁₄N₂O₆) i 568,1350 (molekulska formula C₃₀H₂₁N₃O₉). U cilju eliminisanja signala koji potiču od samog matriksa snimani su i maseni spektri samog matriksa.

III.3. Genotoksičnost ugljeničnih nanocevi

III.3.1. Materijali

Kao materijali čija je genotoksičnost ispitivana korišćene su nefunkcionalizovane CNT, SWCNT (čistoće oko 70%) i MWCNT (čistoće > 99%), dobijene metodom lučnog pražnjenja, i amid-funkcionalizovane SWCNT (čistoće > 90%). Sve navedene CNT su kupljene od proizvođača Sigma-Aldrich.

III.3.2. Ćelijska kultura-humane krvne ćelije

Kultivacija ćelija je izvršena tako što je 0,5 ml pune heparinizirane krvi zasaden u 4,5 ml PB-MAX Karyotyping medijuma (Gibco, Invitrogen). Sa druge strane napravljene su suspenzije ugljeničnih nanocevi (SWCNT, MWCNT i amid-funkcionalizovanih SWCNT) u dimetilsulfoksidu (DMSO) i ultrazvučno dispergovane 30 minuta. Jedan sat nakon inkubacije kulture su tretirane sa četiri različite koncentracije CNT (25 - 150 μ l na 5 ml ukupne zapremine ćelijske kulture).

III.3.3. Mikronukleus test

Analiza mikronukleusa izvršena je korišćenjem Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) tehnike [158]. Kulture limfocita su gajene 72 sata na 37 °C, od čega poslednja 24 sata u prisustvu citohalazina B (Sigma Chemicals. Co) finalne koncentracije 4 μ g/mL. Nakon toga ćelije su isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0,56 % KCl : 0,9 % NaCl, 1:1), a zatim fiksirane u McCarnoy fiksativu (metanol: glacijalna sirćetna kiselina, v/v- 3:1) 3 do 4 puta. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min na 1600 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su pravljani nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Na vazduhu osušeni preparati su obojeni 2 %-tnim rastvorom alkalne Gimze (Giemsa, Sigma-Aldrich).

Analizirano je najmanje 1000 ćelija po uzorku upotrebom AxioImager A1 mikroskopa (Carl Zeiss) na uvećanju 400x ili 1000x. Najmanje 1000 binukleusnih ćelija je brojano da bi se procenio odnos ćelija sa jednim, dva, tri, četiri ili više od četiri mikronukleusa. Citokinezis blok proliferacioni indeks (CBPI) je računat korišćenjem formule:

$$\text{CBPI} = [\text{MI} + 2\text{MII} + 3(\text{MIII} + \text{MIV})] / \text{N} \quad (3.1.)$$

gde MI - MIV predstavlja broj ćelija sa jednim do četiri nukleusa, a N je ukupan broj ćelija.

III.3.4. Ćelijska kultura fibroblasta

Za ćelijsku kulturu humanih fibroblasta normalni humani dermalni fibroblasti HDMEC (PromoCell) su uzgajani pod standardnim uslovima za kulturu tkiva u DMEM dopunjenom sa 10% fetalnog telećeg seruma na 37°C i 10% CO₂. Ćelijske suspenzije su nanošene na polilizinske pločice (Sigma-Aldrich) i inkubirane 24h. Nakon toga ćelije su tretirane sa četiri različite koncentracije ugljeničnih nanocevi (25 - 150 µl na 5 ml ukupne zapremine ćelijske kulture). Kinetika oporavka indukovanih dvolančanih prekida (DSB) je merena nakon 24h.

III.3.5. Imunocitohemijska fluorescencija

Ćelije su tretirane 4% formaldehidom i potopljene u 0,2% Triton-X na 4°C 10 minuta. Pločice su ispirane dejonizovanim fosfatnim puferom (PBS) i tretirane sa 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin) 30 minuta, čime je došlo do blokiranja ćelija.

Nakon blokiranja ćelija sa BSA i ispiranja PBS puferom na ćelije je nanošeno 60 µl primarnog anti-fosfo H2AX (Ser 139) monoklonskog antitela (Upstate Cell Signalling Solutions), pločice su pokrivene parafilmom i ostavljene dva sata na sobnoj temperaturi. Pločice su ispirane 2 puta po 5 min TBST puferom (0,15 M NaCl, 20 mM Tris, 3 mM KCl, 0,05 % Tween 20, pH 7.4). Nakon ispiranja, dodato je 60 µl sekundarnog antitela obeleženog fluorescein izotiocianatom-FITC (Dako), preparati su zatim pokriveni

parafilmom i ostavljeni u vlažnoj mračnoj komori na sobnoj temperaturi. Dva sata nakon tretmana sekundarnim antitelom, preparati su ispirani 3 puta po 5 min. TBST puferom i dehidratirani po 5 min u seriji hladnih rastvora etanola (70 %, 90 % i 100 %). Nakon sušenja na vazduhu, preparati su tretirani sa 15 μ l rastvora fluorescentne boje 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI/Antifade, koncentracije 0,1 μ g/mL (MP Biomedicals) [159].

Ćelije sa γ -H2AX fokusima analizirane su pomoću AxioImagerA1 mikroskopa (Carl Zeiss) sa AxioVision LE programom (AxioVs40 v4.7.1.0, Carl Zeiss). Slike su analizirane i obrađivane pomoću ImageJ v1.44 programa.

IV REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom poglavlju dati su pregled i diskusija dobijenih rezultata, koji su podeljeni u tri celine. Prva celina se odnosi na prečišćavanje CNT, druga na funkcionalizaciju CNT i treća na ispitivanje genotoksičnosti CNT.

IV.1. Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi

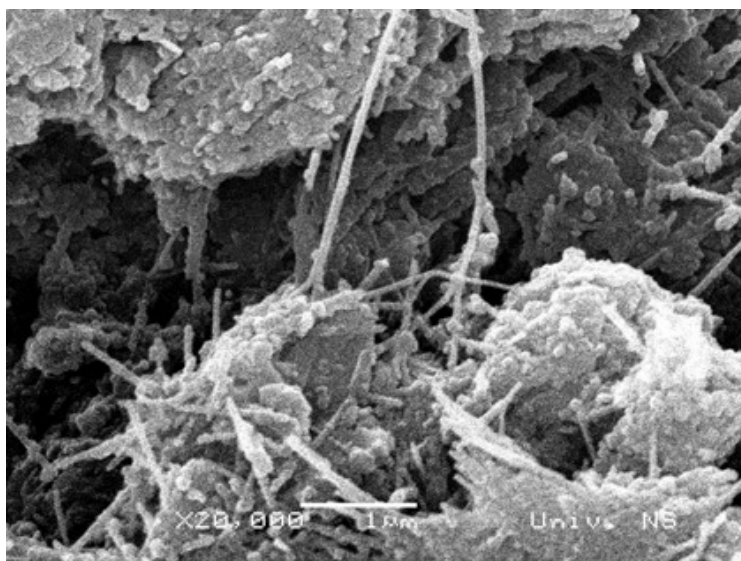
Kao jedan od načina za prečišćavanje CNT u ovom radu, primenjen je postupak ispiranja sa HCl koji je kombinovan sa prethodnim termičkim tretmanom (žarenjem) i ultrazvučnim tretmanom.

U literaturi postoji prihvaćeno stanovište da selektivnom oksidacijom sadržaj CNT može biti povećan, a koje je zasnovano na činjenici da je brzina nagrivanja amorfno ugljenika veća od brzine nagrivanja nanocevi [160]. Pokazano je da je žarenje uspešno korišćeno kao metod za odstranjivanje amorfno ugljenika iz MWCNT, oksidacijom na vazduhu 10 min na 550 °C [161]. Sa druge strane, pokazano je i da ne-oksidativni tretman ispiranjem sa HCl može da se primeni za uspešno odstranjivanje nečistoća (amorfno ugljenika) u uzorcima MWCNT [24].

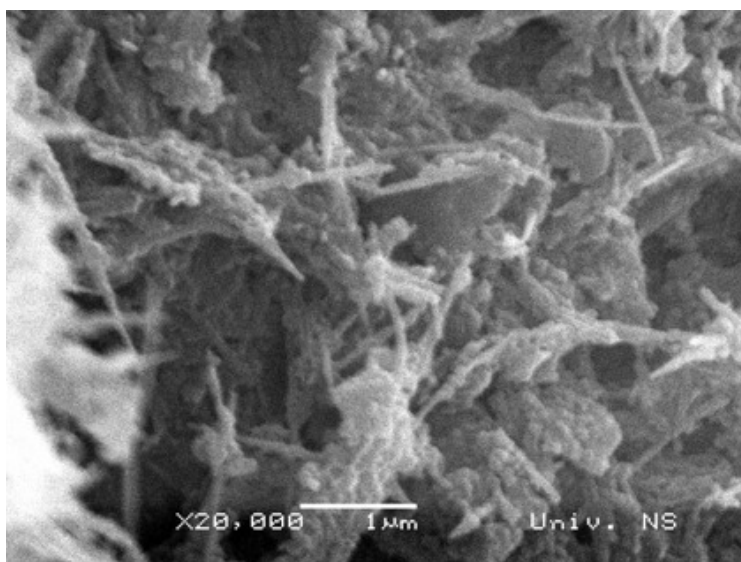
U našem radu tretiranju uzorka ugljeničnih nanocevi kiselinom, u cilju njihovog prečišćavanja, prethodilo je žarenje uzorka na 600°C. Žarenje je rezultovalo gubitkom mase od 10,2%. Nakon toga, materijal je podeljen na dva dela i tretiran 12M HCl i 6M HCl. Merenjem uzoraka nakon tretiranja kiselinom pokazano je da je gubitak mase bio 2,6% i 4,6% respektivno, a u odnosu na masu materijala nakon žarenja. Mali gubitak u masi ukazuje da su nanocevi podvrgnute žarenju koje je praćeno tretiranjem kiselinom prečišćene u izvesnoj meri. Rezultati dobijeni SEM analizom uzorka tretiranog 12M

kiselinom predstavljeni su na slici 11, a uzorka tretiranog 6M kiselinom i ultrazvukom na slici 12.

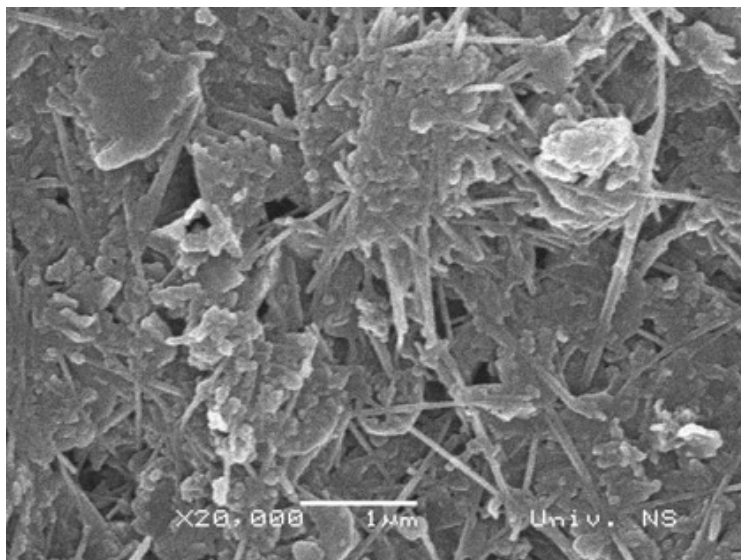
Rezultati SEM merenja uzorka MWCNT nakon prečišćavanja polimerom PmPV predstavljeni su na slici 13.



Slika 11. MWCNT posle tretmana kiselinom (12 M HCl).



Slika 12. MWCNT posle tretmana kiselinom (6 M HCl) u ultrazvučnom kupatilu.

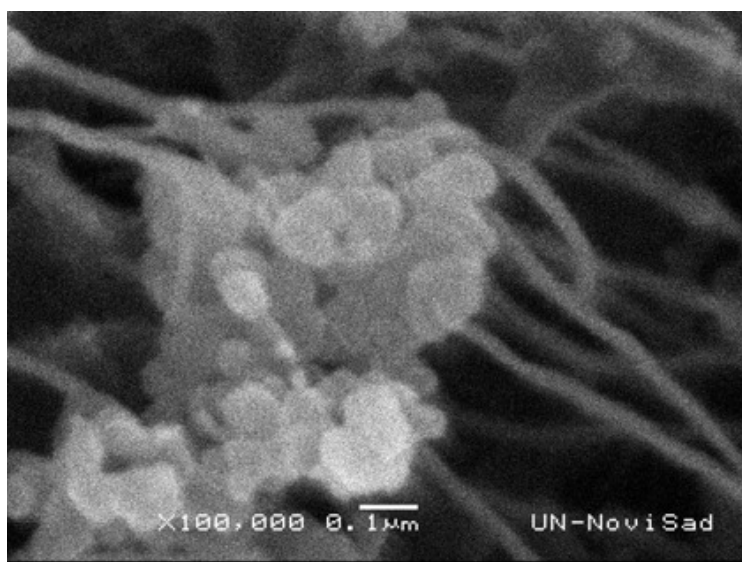


Slika 13. MWCNT prečišćene PmPV-om.

Iako SEM rezultati prikazani na slikama 11 i 12 pokazuju da uzorci nakon izvršenih tretmana nisu potpuno prečišćeni, odnosno sadrže pored CNT i određenu količinu granularne frakcije-nečistoća, oni takođe jasno pokazuju uticaj ultrazvuka na tretirani materijal (MWCNT). Na SEM slici uzorka tretiranog 12M HCl (slika 11) uočavaju se veliki snopovi nanocevi i ugljeničnih nečistoća, prečnika oko 100 nm, a uočava se i prisustvo aglomerata neprečišćenog materijala. Disperzija MWCNT u kiselini je veća u uzorku tretiranom slabijom kiselinom u ultrazvučnom kupatilu u odnosu na uzorak tretiran jačom kiselinom bez primene ultrazvuka. Uočava se da je ultrazvučno tretiranje uzrok disperzije snopova, odnosno da ono omogućuje kiselini da "ispere" uzorak od nečistoća u većoj meri, bez obzira na koncentraciju kiseline.

Prečišćavanje nanocevi organskim polimerom PmPV (slika 13) predstavlja mekši, nedestruktivni način prečišćavanja. SEM slike sirovih (neprečišćenih) i polimerom prečišćenih nanocevi (sa većim uvećanjem) prikazane su na slici 14 i slici 15, respektivno. Uočava se da ovako prečišćene MWCNT (slika 15) imaju uniformne prečnike sa vrednostima od 50-70 nm.

Formiranjem polimer-CNT kompozinih rastvora grafitne nečistoće se izdvajaju kao talog u ovim rastvorima. CNT pokazuju poboljšanu disperzivnost u polimernom rastvoru jer postoji dobra interakcija heksagonalnih prstenova CNT i benzenovih prstena u PmPV.



Slika 14. Sirove (neprečišćene) MWCNT.



Slika 15. MWCNT nakon prečišćavanja polimerom PmPV.

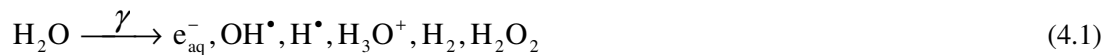
Poredeći SEM mikrografe uzoraka tretiranih žarenjem i kiselinom sa onim za uzorke prečišćene primenom polimera PmPV može se zaključiti da je sadržaj nanocevi u odnosu na nečistoće veći a aglomerati neprečišćenog materijala su manji kada su MWCNT prečišćavane polimerom PmPV.

Pokazano je da nanocevi mogu biti u značajnoj meri prečišćene nedestruktivnom metodom, korišćenjem polimera.

Za kvantitativniju procenu stepena prečišćenosti (preostale količine neuređenog, amorfnog ugljenika) MWCNT potrebno je primeniti i druge metode karakterizacije, kao npr. ramansku spektroskopiju ili difrakciju X zraka (XRD), što će biti predmet budućeg rada.

IV.2. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi klasterima srebra

Joni plemenitih metala mogu biti redukovani izlaganjem njihovih vodenih rastvora dejstvu γ -zračenja. Tom prilikom dolazi do procesa radiolize vode (jednačina 4.1).



Nastali hidratizirani elektroni (e_{aq}^-) i atomi vodonika (H^\bullet) su jaki redukujući agensi, a hidroksilni radikali (OH^\bullet) oksidujućim agensi. Da bi se izbegli neželjeni procesi oksidacije rastvoru se može dodati hvatač ("skevendžer") OH^\bullet radikala, najčešće 2-propanol, koji konvertuje oksidujuće u redukujuće vrste. U ovom radu, sekundarni alkohol nije dodat. PVA, stabilizujući agens, zavisno od eksperimentalnih uslova može da reaguje kao "skevendžer", odnosno supstanca koja ima sposobnost da hemijski reaguje sa nepoželjnim vrstama i na taj način ih ukloni iz sistema ili ih učini neaktivnim, kao i za sintezu Ag nanočestica.

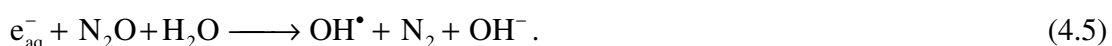
Ozračivanjem PVA u vodenom rastvoru dolazi do nastanka polimernih radikala PVA^\bullet zahvaljujući OH^\bullet i H^\bullet radikalima koji potiču iz molekula vode i koji vezuju atome vodonika iz $-\text{CH}(\text{OH})-$ i/ili $-\text{CH}_2-$ grupa PVA (jednačina 4.2) [162 - 164].



Dejstvom γ -zračenja na argonom zasićene vodene rastvorenje koji sadrže PVA i AgNO_3 , za redukciju Ag^+ jona su odgovorne dve redukujuće vrste – hidratizirani elektroni nastali radiolizom vode (jednačina 4.3) i polimerni radikali (jednačina 4.4) [92].



Sa druge strane, ukoliko se vodeni rastvori zasite N_2O , tokom γ -radiolize dolazi do kvantitativnog prevođenja hidratiziranih elektrona u hidroksilne radikale (jednačina 4.5):

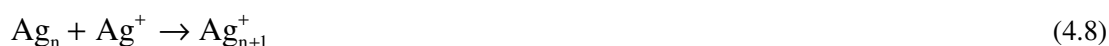


Nastali hidroksilni radikali se troše u reakciji (4.2) pri procesu nastajanja polimernih PVA[•] radikala. Tako u procesu redukcije Ag⁺ jona u N₂O zasićenim vodenim rastvorima učestvuju samo PVA[•] radikali [165]. Pored toga, PVA[•] radikali mogu interagovati sa CNT i vezivati se za njih [92].

Nezavisno od postupka sinteze, nastali atomi srebra mogu da formiraju dimere prilikom sudara (jednačina 4.6) i/ili se spajaju sa viškom jona (jednačina 4.7), što vodi formiranju metalnih klastera (jednačina 4.8):



.....



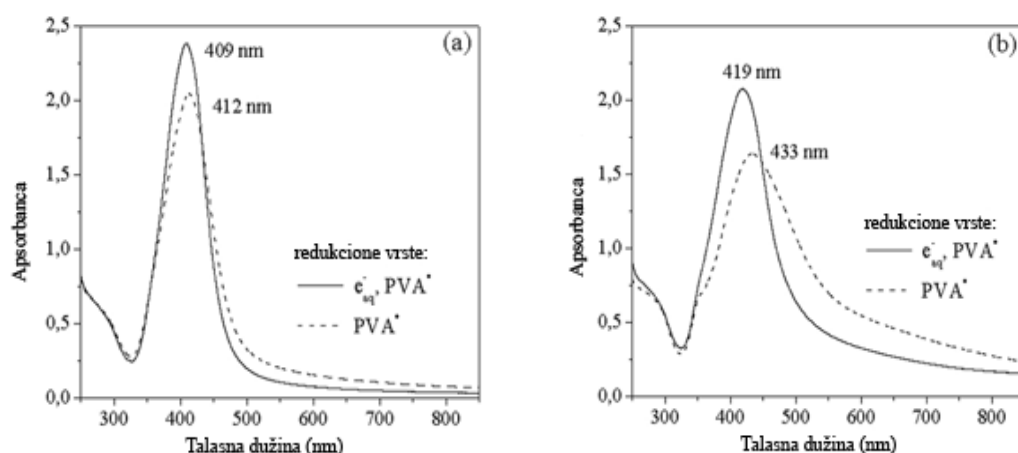
U mehanizmu rasta klastera veoma značajnu ulogu imaju reakcije sudara jona sa atomima ili klasterima srebra. Redukcioni procesi slobodnih i adsorbovanih Ag⁺ jona su konkurentni i kontrolisani su brzinom formiranja redukcionih radikala. Shodno tome, formiranje klastera direktnom redukcijom, praćeno sudarima, je dominantno pri većim brzinama doze zračenja, kada se dobijaju klasteri manjih dimenzija [166].

Kao što je opisano, sinteza klastera srebra i funkcionalizacija CNT ovim klasterima, a uz pomoć polimera i γ -zračenja vršena je u dva različita sistema, gde su u zavisnosti od gasa (Ar ili N₂O) kojim su zasićeni rastvori CNT, PVA i AgNO₃, a koji su potom izloženi dejstvu γ -zračenja, različite redukcionne vrste odgovorne za redukciju jona srebra. Tako su sistemi Ag-funkcionalizovanih SWCNT i MWCNT u argonu sintetisani pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•], a sistemi Ag-funkcionalizovanih SWCNT i MWCNT u N₂O sintetisani samo pomoću PVA[•] radikala.

Nanočestice plemenitih metala u zavisnosti od oblika i veličine, ispoljavaju specifična optička svojstva koja se mogu pratiti UV-Vis spektroskopijom. Smanjenje dimenzija čestica na red veličine nanometra dovodi do promene optičkih svojstava, uzrokujući pojavu karakteristične površinske plazmonske apsorpcije (*surface plasmon resonance* SPR). U vidljivoj oblasti spektra elektromagnetnog zračenja se javlja

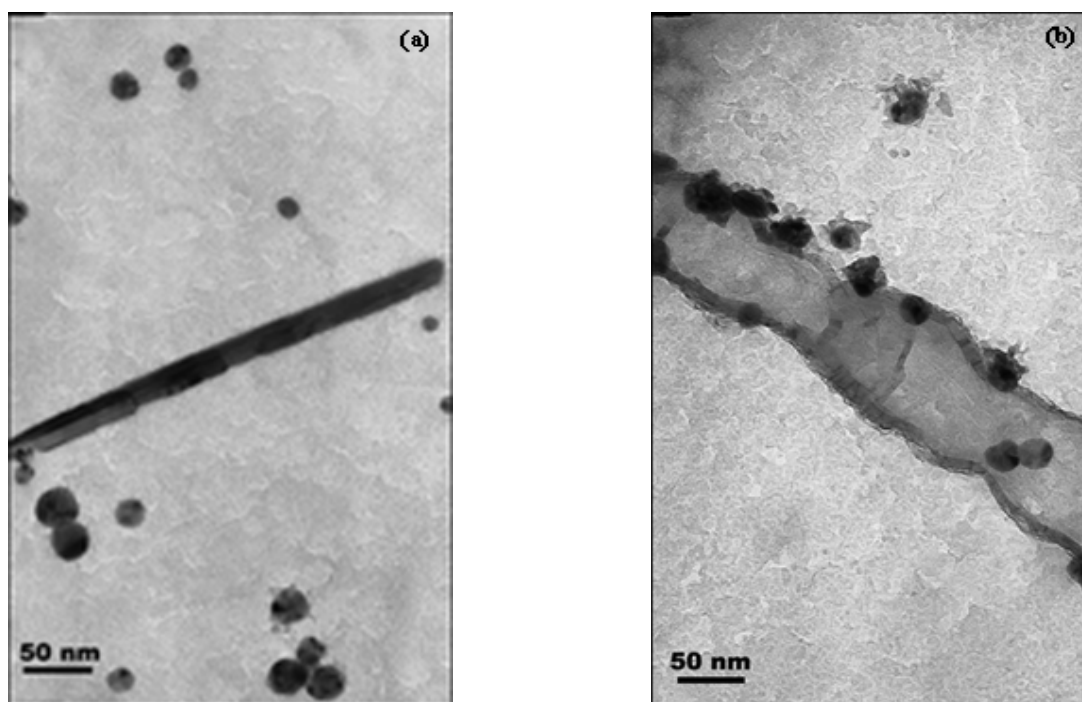
apsorpciona traka sa tačno definisanim položajem apsorpcionog maksimuma kao posledica ponašanja provodnih elektrona [167]. Talasna dužina maksimuma apsorpcije i širina apsorpcione trake zavise od veličine i oblika nanočestica i okruženja u kom se nanočestice nalaze.

Optički apsorpcioni spektri pripremljenih uzoraka prikazani su na slici 16, gde slika 16(a) prikazuje apsorpcione spektre Ag/PVA/SWCNT, a slika 16(b) apsorpcione spektre Ag/PVA/MWCNT. U spektru se javlja karakteristična traka sa maksimumom u opsegu 409-433 nm, koja predstavlja karakterističnu plazmonsku apsorpciju, koja ukazuje na formiranje Ag nanočestica [168, 169]. Takođe se jasno može videti (isprekidana linija) da PVA[•] radikali imaju dovoljnu redukcionu sposobnost da konvertuju Ag iz jonskog u atomsko stanje odnosno da proizvedu Ag nanočestice [165]. Uočava se da su karakteristične trake za uzorke Ag/PVA/SWCNT i Ag/PVA/MWCNT sintetisane samo sa PVA[•] radikalima (isprekidane linije) malo pomerene ka većim talasnim dužinama u odnosu na karakteristične trake istih uzoraka sintetisanih pomoću hidratisanih elektrona i PVA[•]. Takođe, uočava se da se karakteristične trake uzoraka Ag/PVA/MWCNT (slika 16(b)) javljaju na većim talasnim dužinama u odnosu na karakteristične trake uzoraka Ag/PVA/SWCNT (slika 16(a)). Pomeranje apsorpcionih traka ka većim talasnim dužinama je najverovatnije posledica nastanka nešto većih Ag nanočestica u uslovima kada se sinteza vrši samo sa PVA[•] radikalima, odnosno u sistemima Ag/PVA/MWCNT.

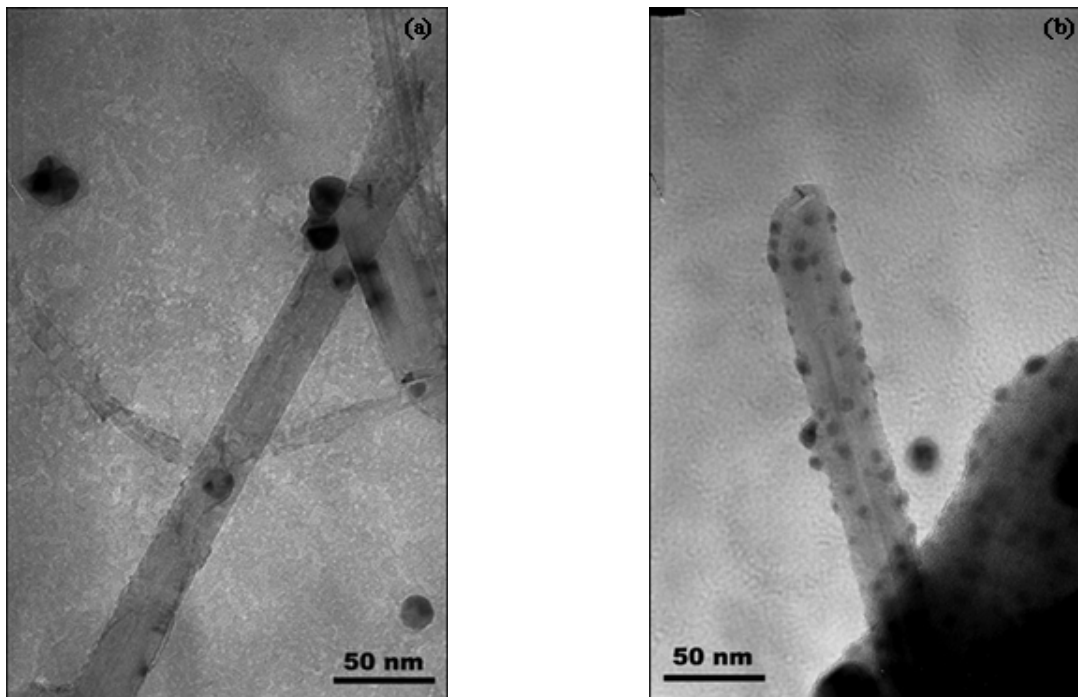


Slika 16. Apsorpcioni spektri (a) Ag/PVA/SWCNT i (b) Ag/PVA/MWCNT, sintetisani pri različitim uslovima: pomoću hidratisanih elektrona i PVA[•] (puna linija) ili samo sa PVA[•] radikalima (isprekidana linija).

Kao jedna od metoda za analizu dobijenih funkcionalizovanih CNT u ovom radu korišćena je TEM mikroskopija. Rezultati TEM merenja (slike 17 i 18) pokazuju uspešnu funkcionalizaciju SWCNT i MWCNT. Ag nanočestice su deponovane na površinu CNT, dok struktura nanocevi ostaje nedirnuta. TEM analiza pokazuje prisustvo Ag nanočestica skoro sfernog oblika (slike 17 i 18). Prečnici ovih čestica su, prema TEM merenjima, u rasponu od 5 do 30 nm, što je u saglasnosti sa rezultatima koje daju apsorpcioni spektri sintetisanih uzoraka. Slike 17(a) i 17(b) prikazuju rezultate TEM merenja za Ag/PVA/SWCNT, sintetisane pomoću hidratizanih elektrona i PVA[•] ili samo pomoću PVA[•] radikala kao redukujućih vrsta, redom. TEM slike Ag/PVA -funkcionalizovanih MWCNT su prikazane na slici 18(a) i 18(b). TEM rezultati pokazuju da je funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi nanočesticama srebra mnogo bolja kada se Ag/PVA funkcionalizacija nanocevi pomoću γ -zračenja odvija samo sa PVA[•] radikalima, kako za SWCNT, tako i za MWCNT.



Slika 17. TEM slike Ag/PVA/SWCNT kompozita sintetisanih pomoću hidratizanih elektrona i PVA[•] (a) i pomoću PVA[•] radikala (b).



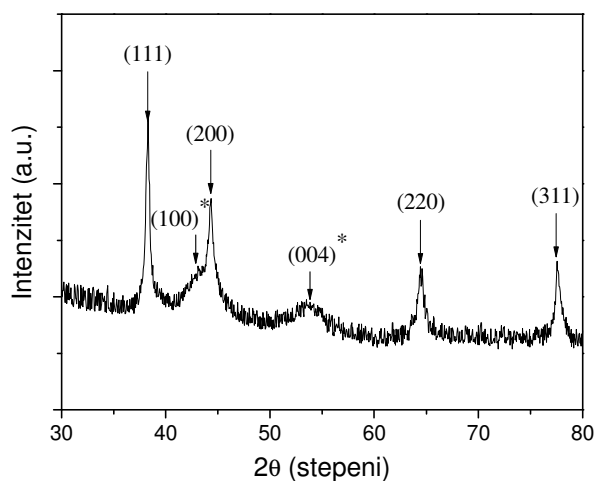
Slika 18. TEM slike Ag/PVA/MWCNT sintetisanih pomoću hidratiziranih elektrona i PVA[•] (a) i pomoću PVA[•] radikala (b).

Pošto je analizom TEM slika utvrđeno da je funkcionalizacija CNT klasterima srebra efikasnija primenom samo PVA[•] radikala to je strukturna analiza urađena samo za ove uzorke. Strukturna analiza ispitivanih Ag-funkcionalizovanih CNT izvršena je primenom difrakcije X zraka. Slika 19 predstavlja difraktogram uzorka Ag/PVA/MWCNT sintetisanog samo polimernim radikalima (gde je funkcionalizacija mnogo bolja, kao što je pokazano TEM-om, slika 18b). Svi istaknuti pikovi sa vrednostima 2θ od 38.1° , 44.3° , 64.4° i 77.4° predstavljaju Bragg-ove refleksije sa kristalnih ravni (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) i (3 1 1), respektivno, koje odgovaraju površinski centriranoj kubnoj strukturi srebra, što je u saglasnosti sa rezultatima iz literature [73, 170]. Primenom Sherrer-ove formule na dobijene difraktograme izračunata je veličina kristalnog domena d:

$$d = k\lambda / \beta \cos\theta \quad (4.9)$$

gde je k konstanta kubne strukture (0.9), λ talasna dužina X zraka (0.1541 nm), β poluširina pika i θ ugao difrakcije. Izračunata vrednost veličine kristalnog domena je oko 19 nm, što je u saglasnosti sa prosečnim prečnikom Ag nanočestica određenim na osnovu TEM merenja (slike 17 i 18). Difrakcija rendgenskih zraka nije utvrdila postojanje pikova srebra oksida.

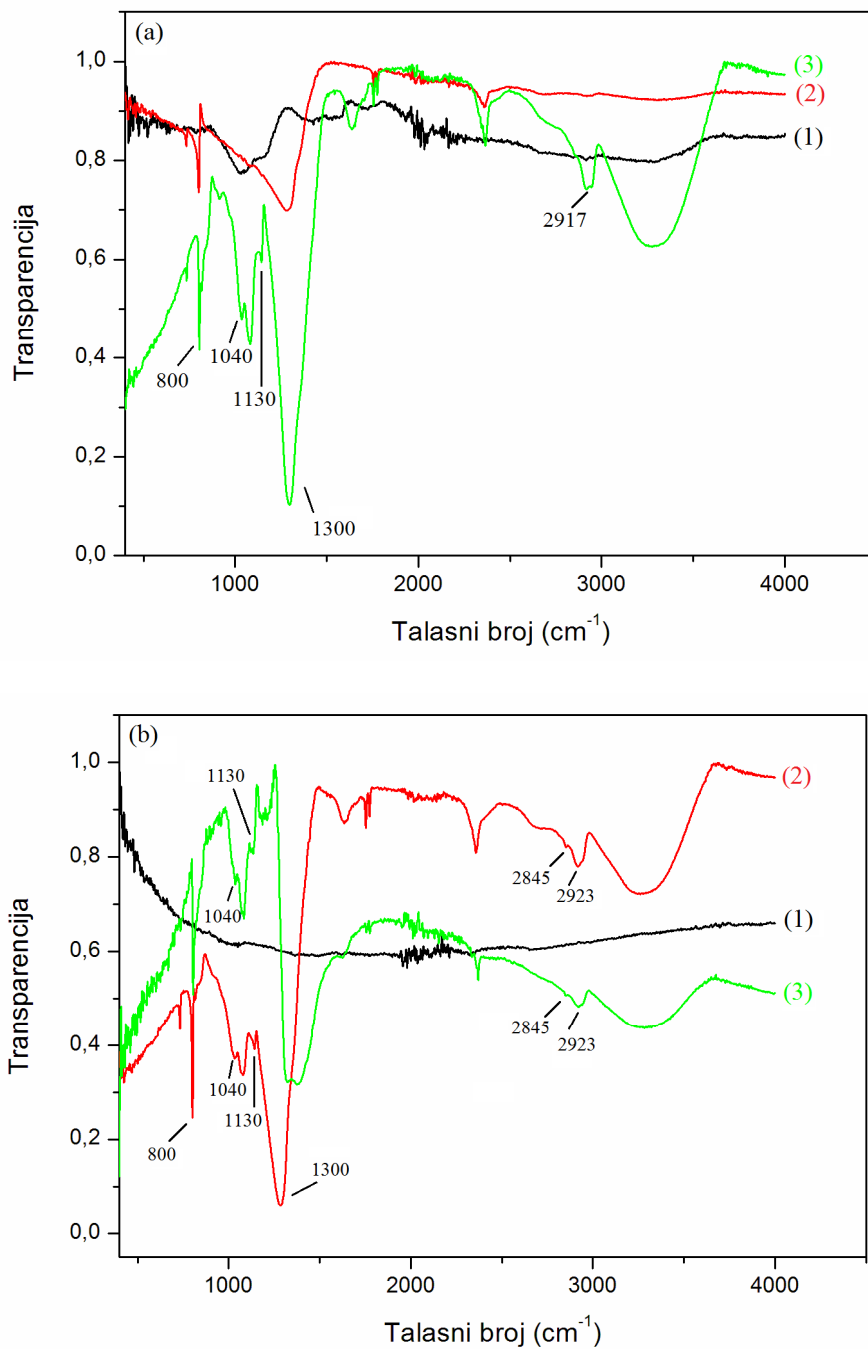
Na difraktogramu prikazanom na slici 19 osim pikova koji potiču od srebra uočavaju se i slabo izraženi pikovi koji potiču od MWCNT, vrednosti 2θ od 42.8° koji odgovara (1 0 0) refleksiji i vrednosti 2θ od 53.8° koji odgovara (0 0 4) refleksiji [171, 172]. Kako XRD nije snimljen ispod vrednosti 2θ od 30° to na ovoj slici nije prikazan pik na 25.8° karakterističan za MWCNT a koji se javlja prema podacima iz literature [172].



Slika 19. XRD difraktogram Ag/PVA/MWCNT sintetisanog pomoću PVA \cdot radikala. Pikovi koji potiču od MWCNT su označeni zvezdicom.

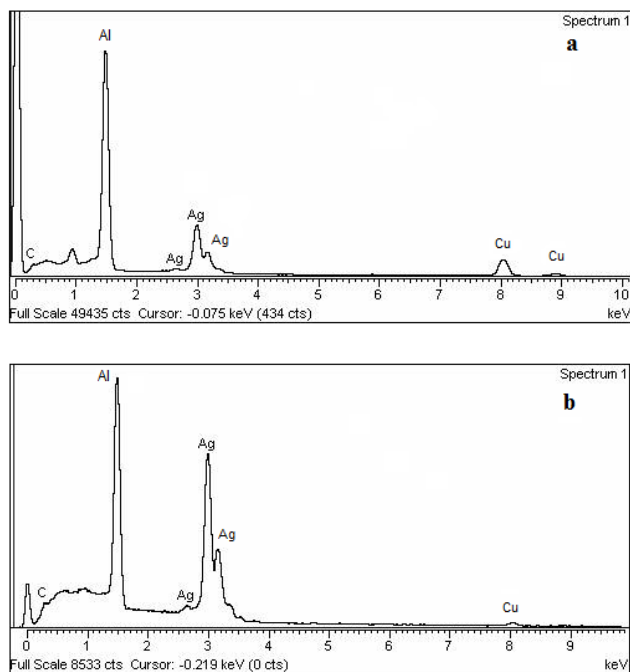
U cilju određivanja interakcije između Ag nanočestica, polimernih lanaca PVA i ugljeničnih nanocevi u sistemu, snimljeni su FTIR spektri dobijenih Ag-funkcionalizovanih CNT i FTIR spektri samih CNT (slika 20). Trake na oko 2850 i 2920 cm^{-1} koje se javljaju u spektrima funkcionalizovanih CNT upućuju na vezivanje PVA u ovim uzorcima, što može biti objašnjeno vezivanjem alkil grupa na površinu CNT [94]. Traka na oko 2920 cm^{-1}

odgovara asimetričnoj vibraciji CH₂ grupe, a traka na 2850 cm⁻¹ se pripisuje simetričnoj vibraciji CH₂ grupe. Traka na 1130 cm⁻¹ može se pripisati zameni metilenske grupe kiseonikovim atomom, izazivajući pojavu C-O istežuće vibracije [173]. Pik na 1040 cm⁻¹ odgovara C-O-C vibracijama, što ukazuje na umrežavanje polimera, što dodatno stabilise sistem [174]. Široka traka u oblasti 3000-3600 cm⁻¹ može se pripisati prisustvu -OH grupa iz PVA i molekulske vode u filmovima. Na slici 20(a) se uočava odsustvo ove trake za uzorak Ag/PVA/SWCNT sintetisan pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•]. Pored toga uočava se da su trake na 1040 i 1130 cm⁻¹ jasno izražene za uzorak Ag/PVA/SWCNT sintetisan samo pomoću PVA[•] radikala, dok za uzorak Ag/PVA/SWCNT sintetisan pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•] to nije slučaj. Kako ove trake govore o vezivanju i umrežavanju polimera, to se može zaključiti da je ono izraženije kod uzorka Ag/PVA/SWCNT sintetisanog samo pomoću PVA[•] radikala, te da je kod ovog uzorka bolja i sama funkcionalizacija CNT klasterima srebra. Kod uzoraka Ag/PVA/MWCNT (slika 20(b)) se ne uočava bitna razlika u spektrima Ag/PVA/MWCNT sintetiranih pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•] i Ag/PVA/MWCNT sintetiranih samo pomoću PVA[•] radikala, te se na osnovu FTIR spektara ne može zaključivati o razlikama između ovih uzoraka u smislu interakcije CNT i polimera. Osim navedenih traka koje govore o interakciji polimera i CNT, u FTIR spektrima uzoraka funkcionalizovanih CNT se uočavaju i traka na 800 cm⁻¹ - koja odgovara vibracijama C-H veze izvan ravni i karakteristična je traka PVA, i veoma jaka traka koja se javlja na oko 1300 cm⁻¹ koja odgovara OH deformacionoj vibraciji (u ravni) iz PVA. Ova traka je očekivano jaka i javlja se kod primarnih i sekundarnih alkohola.



Slika 20. (a) FTIR spektri: (1) SWCNT, (2) Ag/PVA/SWCNT sintetisanih pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•] kao redukcionih vrsta, (3) Ag/PVA/SWCNT sintetisanih samo pomoću PVA[•] radikala; (b) FTIR spektri: (1) MWCNT, (2) Ag/PVA/MWCNT sintetisanih pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•] kao redukcionih vrsta, (3) Ag/PVA/MWCNT sintetisanih samo pomoću PVA[•] radikala kao redukcijske vrste.

Prisustvo nanočestica srebra u uzorcima funkcionalizovanih SWCNT potvrđeno je EDX merenjima u određenim tačkama uzoraka sa SEM slika. EDX merenja su urađena u cilju kvalitativnog dokaza prisustva srebra u uzorcima. Slika 21 prikazuje EDX spektre. Slike 21 (a) i (b) predstavljaju rezultate EDX merenja za uzorke Ag/PVA/SWCNT, sintetisane elektronima i PVA[•] (a) ili samo PVA[•] radikalima (b), respektivno. Prikazani EDX spektri (slike 21 (a) i (b)) ukazuju na prisustvo ugljenika i srebra u uzorcima. Pored toga na spektrima se uočava pik na oko 1,5 keV koji potiče od aluminijuma kojim su naparavani uzorci. Posmatranjem relativnog odnosa signala Ag u uzorcima Ag/PVA/SWCNT (sintetisanog pomoću hidratisanih elektrona i PVA[•]) (slika 21(a)) i Ag/PVA/SWCNT (sintetisanog samo pomoću PVA[•]) (slika 21(b)) uočava se da je ovaj signal značajno izraženiji u uzorku prikazanom na slici 21(b) u odnosu na uzorak na slici 21(a), a da je u oba slučaja signal Ag značajno jači od signala C. Ovi rezultati pokazuju slaganje sa rezultatima TEM merenja, prema kojima je funkcionalizacija CNT klasterima srebra mnogo bolja kada se odvija samo sa PVA[•] radikalima.

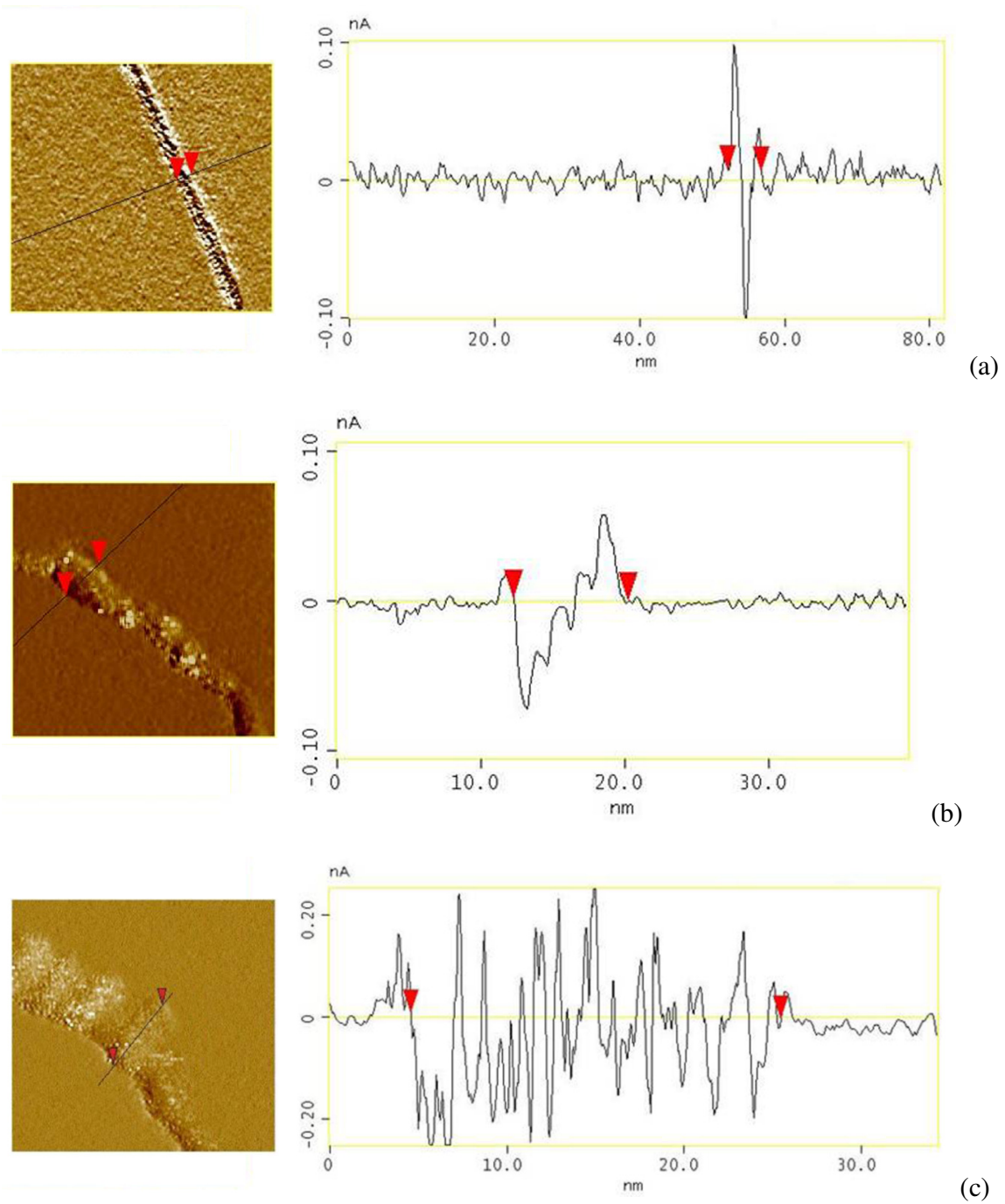


Slika 21. EDX spektri: (a) Ag/PVA/SWCNT (sintetisanog pomoću hidratisanih elektrona i PVA[•]), (b) Ag/PVA/SWCNT (sintetisanog samo pomoću PVA[•]).

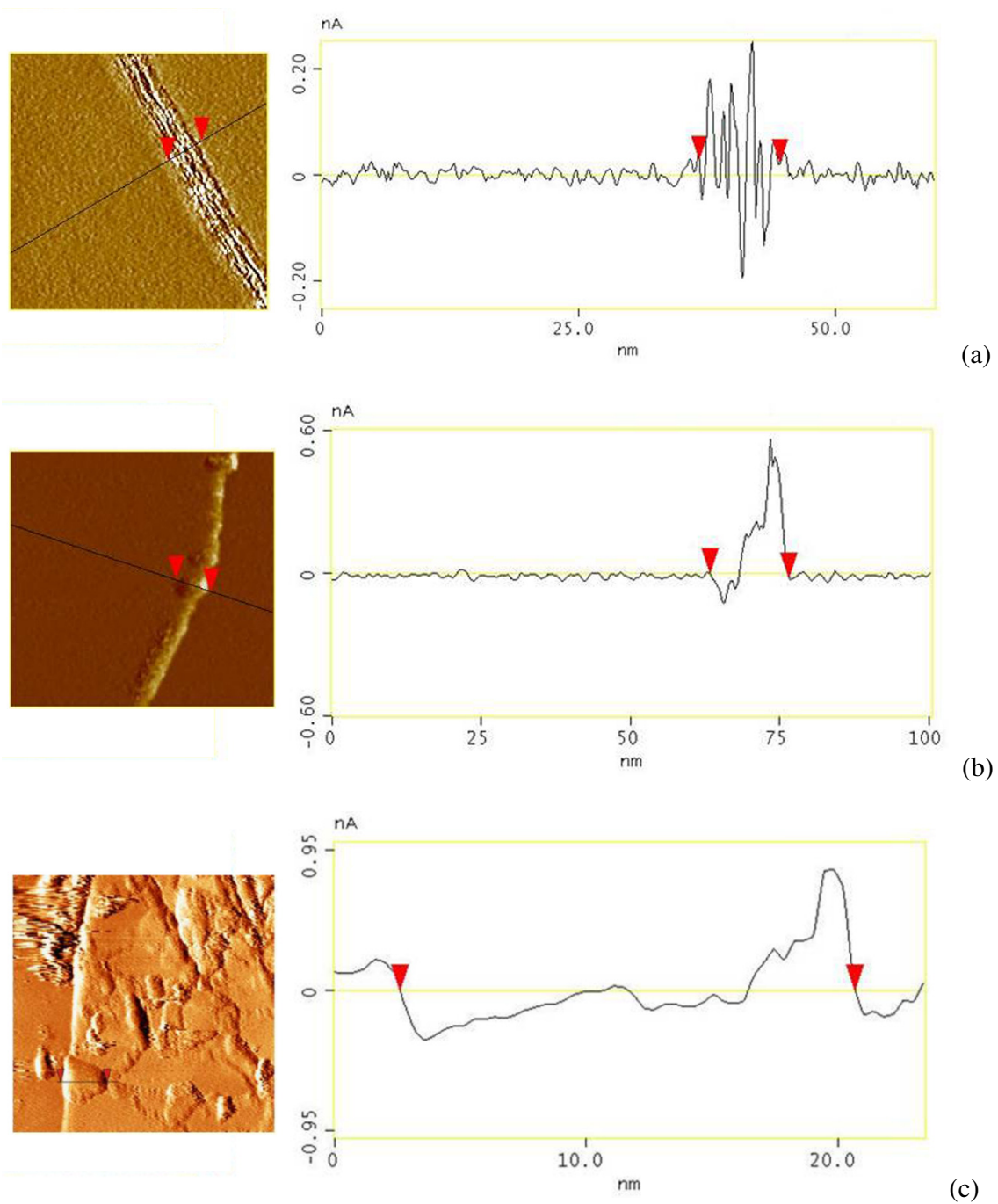
STM karakterizacija je rađena na nefunkcionalizovanim i funkcionalizovanim CNT. Rezultati STM karakterizacije su prikazani na slikama 22-24. Slike 22 (a)–(c) predstavljaju STM slike SWCNT, Ag-funkcionalizovanih SWCNT (sintetisanih elektronima i PVA[•]) i Ag-funkcionalizovanih SWCNT (sintetisanih samo PVA[•] radikalima) respektivno. Na desnoj strani svake od pomenutih slika prikazani su poprečni preseki. Sa dela slike 22 (a), gde je prikazan poprečni presek, vidi se da je prečnik SWCNT prikazane na slici 4,5 nm. Sa slike 22 (b) se uočava da je prikazani prečnik koji odgovara klasteru srebra vezanom na SWCNT 8,5 nm, dok je u slučaju funkcionalizacije samo PVA[•] radikalima (slika 22 (c)) prikazani prečnik 21 nm. Poređenjem slika 22 (b) i (c), koje prikazuju funkcionalizovane nanocevi, sa slikom 22(a), vidi se da su Ag nanočestice dobro raspoređene na površini SWCNT.

STM slike, sa prikazanim poprečnim presecima, za MWCNT i Ag-funkcionalizovane MWCNT prikazane su na slikama 23 (a)-(c). Poprečni presek prikazan na slici 23 (a) pokazuje prečnik MWCNT od 7,9 nm. Kao što je već pokazano TEM merenjima, Ag klasteri su formirani i dobro raspoređeni na površini MWCNT (slika 23 (b) i 23 (c)). Poprečni presek prikazan na slici 23 (b) odgovara klasteru srebra vezanom na MWCNT u slučaju funkcionalizacije pomoću hidratiranih elektrona i PVA[•] radikala i iznosi 13,5 nm. Na slici 23 (c) poprečni presek klastera srebra vezanog za MWCNT u slučaju funkcionalizacije samo PVA[•] radikalima iznosi 18,5 nm.

Na osnovu STM rezultata za uzorke prikazane na slikama 22 i 23 zaključuje se da su detektovani veći klasteri Ag u slučaju kada je sinteza Ag funkcionalizovanih SWCNT i MWCNT vršena samo PVA[•] radikalima.

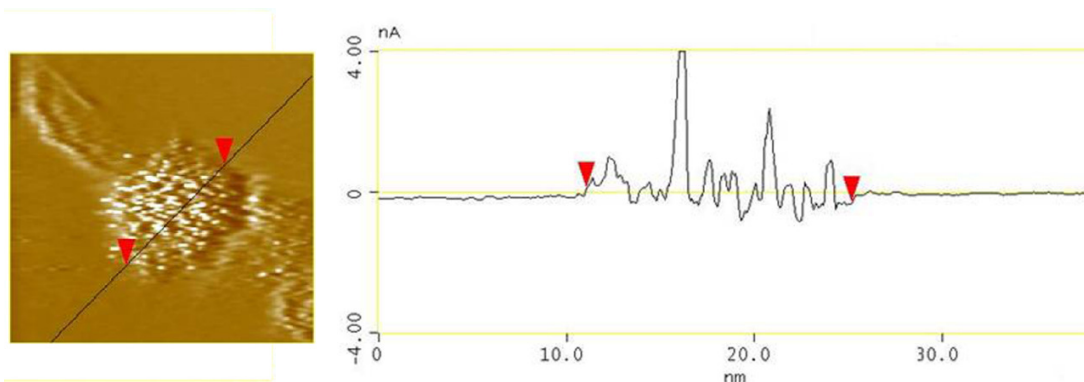


Slika 22. (a) STM slika (76nm x 76nm) SWCNT, (b) STM slika (47nm x 47nm) Ag/PVA/SWCNT (sintetisanog pomoću hidratiziranih elektrona i PVA⁺), (c) STM slika (69nm x 69nm) Ag/PVA/SWCNT (sintetisanog samo pomoću PVA⁺).



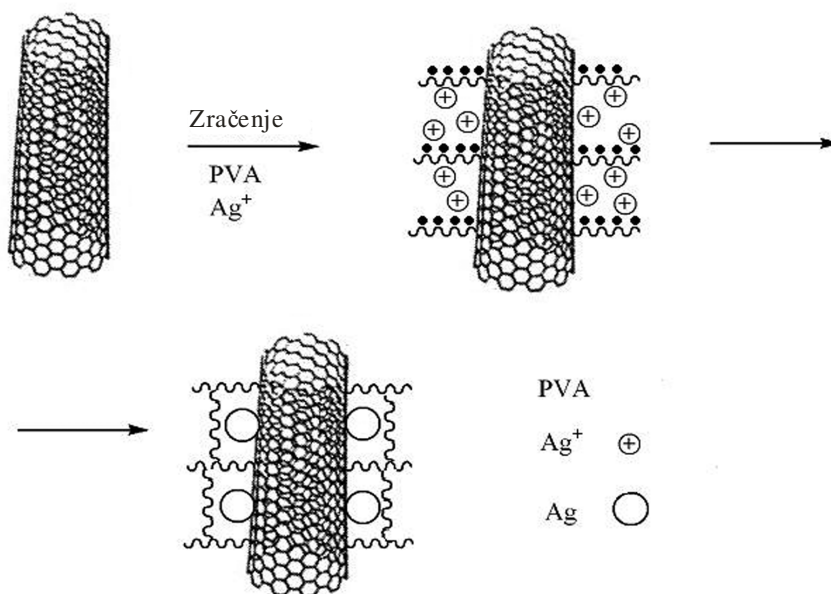
Slika 23. (a) STM slika (52nm x 52nm) MWCNT, (b) STM slika (95nm x 95nm) Ag/PVA/MWCNT kompozita (sintetisanog pomoću hidratiranih elektrona i PVA⁺), (c) STM slika (100nm x 100nm) Ag/PVA/MWCNT (sintetisanog samo pomoću PVA⁺).

Slika 24 je STM slika samog Ag klastera formiranog na površini ugljenične nanocevi. Prečnik ovog klastera je 14,5 nm.



Slika 24. STM slika (30nm x 30nm) Ag klastera.

Poređenjem rezultata kako za Ag-funkcionalizovane SWCNT tako i za Ag-funkcionalizovane MWCNT a zavisno od različitog hemijskog puta prilikom γ -zračenja koji je korišćen pri sintezi Ag/PVA/CNT, dolazi se do zaključka da je funkcionalizacija CNT Ag klasterima mnogo bolja kada je sistem Ag/PVA/CNT nastao korišćenjem samo PVA \cdot radikala kao redukujuće vrste.



Slika 25. Šematski prikaz mehanizma formiranja Ag/PVA/CNT pod uticajem γ -zračenja.

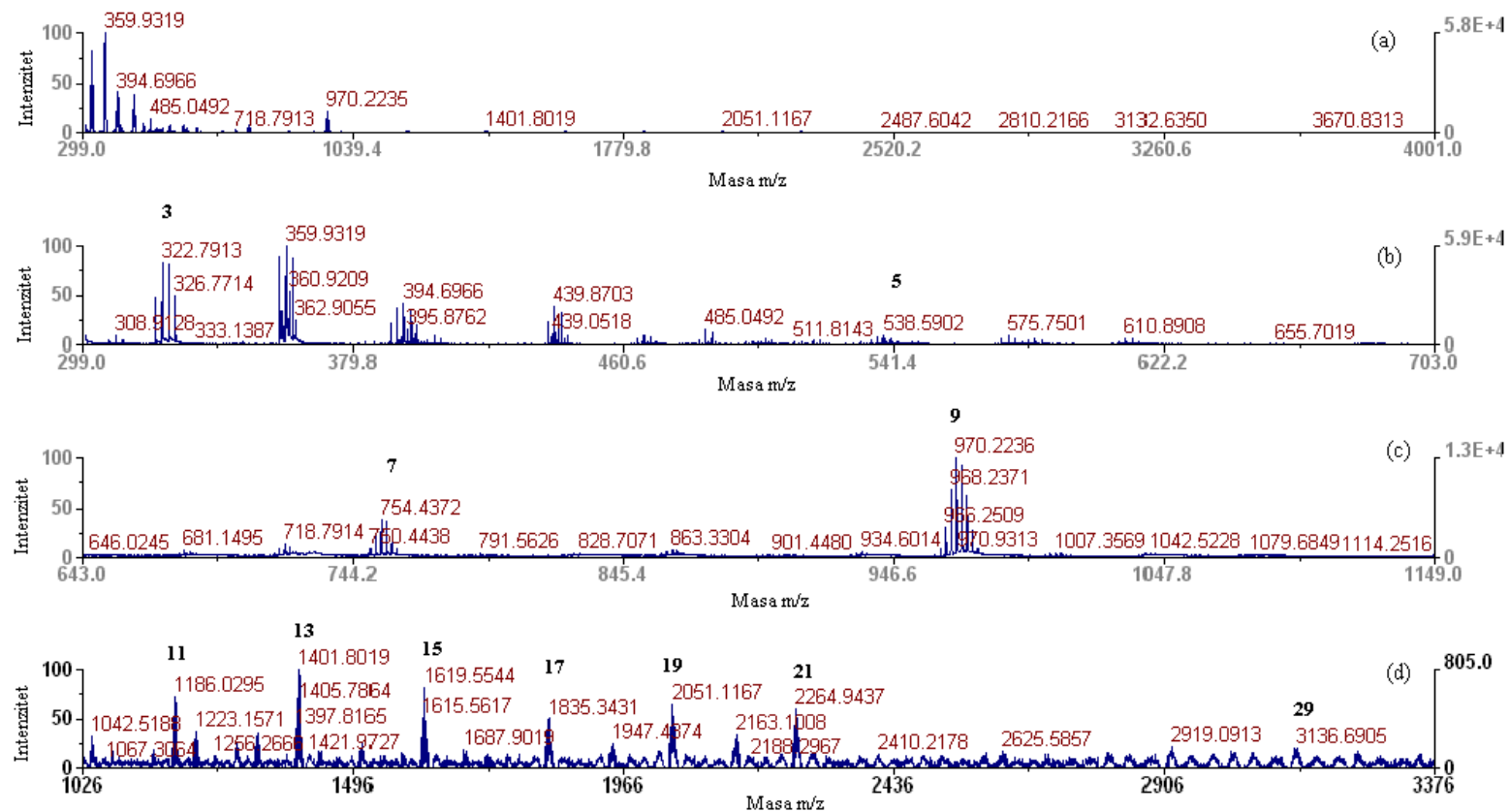
Šematski prikaz funkcionalizacije CNT pod uticajem γ -zračenja prikazan je na slici 25. Šema ukazuje na mehanizam formiranja Ag nanočestica i na umrežavanje polimernih lanaca, što dodatno stabilizuje sistem.

IV.2.1. MALDI TOF i teorijska ispitivanja klastera srebra dobijenih γ -zračenjem

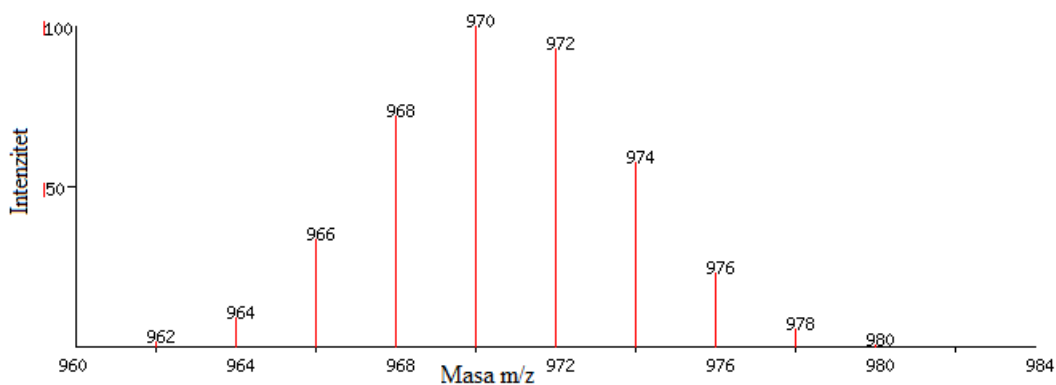
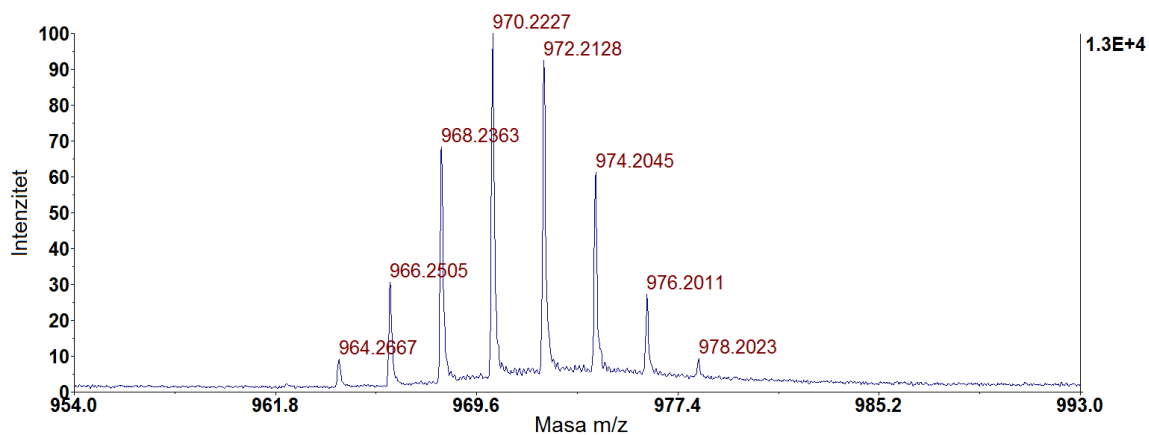
Masena spektrometrija je jedna od najkorisnijih eksperimentalnih metoda u izučavanju metalnih klastera u gasnoj fazi jer daje neophodne informacije o masi i veličini klastera. Obzirom da klasteri veće stabilnosti karakterišu i veća zastupljenost, masena distribucija klastera daje korisne informacije o stabilnosti klastera otkrivajući pri tome i klasteri "magičnih brojeva" koji pokazuju značajno veću zastupljenost u masenim spektrima u odnosu na susedne klasteri.

Da bi se analizirali klasteri srebra koji su funkcionalizovali ugljenične nanocevi, uzorci dobijeni funkcionalizacijom CNT klasterima srebra primenom γ -zračenja su analizirani maseno spektrometrijski [175]. Rezultati pokazuju da su formirani pozitivni joni klastera srebra u prisustvu CHCA matriksa u oba moda rada, a da je rezolucija bolja kada se radi u reflektromnom modu. Slika 26 prikazuje da su maseno spektrometrijski detektovani klasteri srebra koji sadrže 3-29 atoma srebra, pri čemu zadovoljavajuću stabilnost pokazuju klasteri sa do 21 atomom srebra. Pikovi koji odgovaraju pozitivnim jonima klastera koji sadrže neparan broj atoma srebra su приметно većeg intenziteta od pikova koji odgovaraju pozitivnim jonima klastera koji sadrže paran broj atoma srebra. Najintenzivniji pikovi u spektru su na pozicijama m/z 322.7913 538.5902, 754.4372 i 970.2236, koji odgovaraju klasterima sa 3, 5, 7 i 9 atoma srebra. Sa ciljem poređenja dobijenih masenih spektara sa teorijskim masenim spektrima, u smislu masa karakterističnih za određeni klaster, na slici 27 su prikazani eksperimentalno dobijeni i teorijski maseni spektar za klaster od devet atoma srebra, Ag_9^+ . Eksperimentalno dobijeni maseni spektar za Ag_9^+ koji je prikazan na

slici 27 gore predstavlja uvećani deo spektra sa slike 26. Ovaj klaster je izabran zbog značaja koji ima u smislu izražene stabilnosti [176]. Slika 27 pokazuje dobro slaganje eksperimentalnog i teorijskog masenog spektra klastera Ag_9^+ .

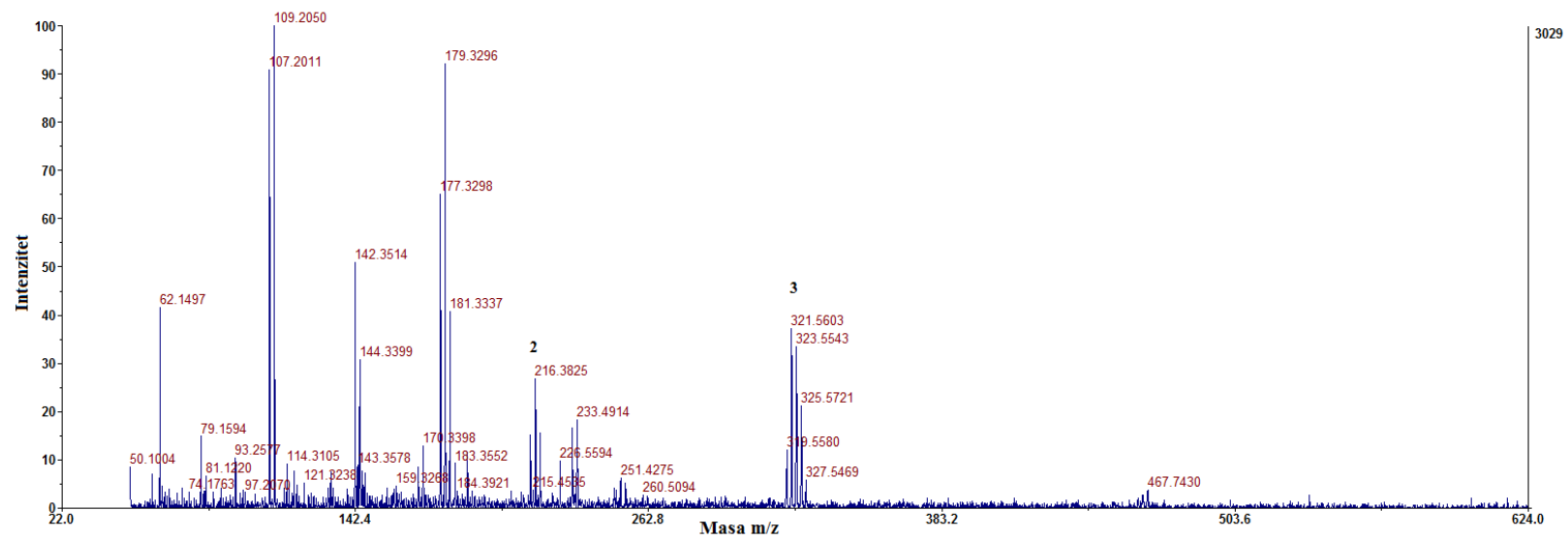


Slika 26. MALDI TOF spektri katjona klastera srebra, gde su prikazani različiti opsezi m/z: (a) m/z od 299 do 4001; (b) m/z od 299 do 703; (c) m/z od 643 do 1149; (d) m/z od 1026 do 3376. Brojevi 3 do 29 označavaju broj atoma Ag koji se nalaze u određenom klasteru.



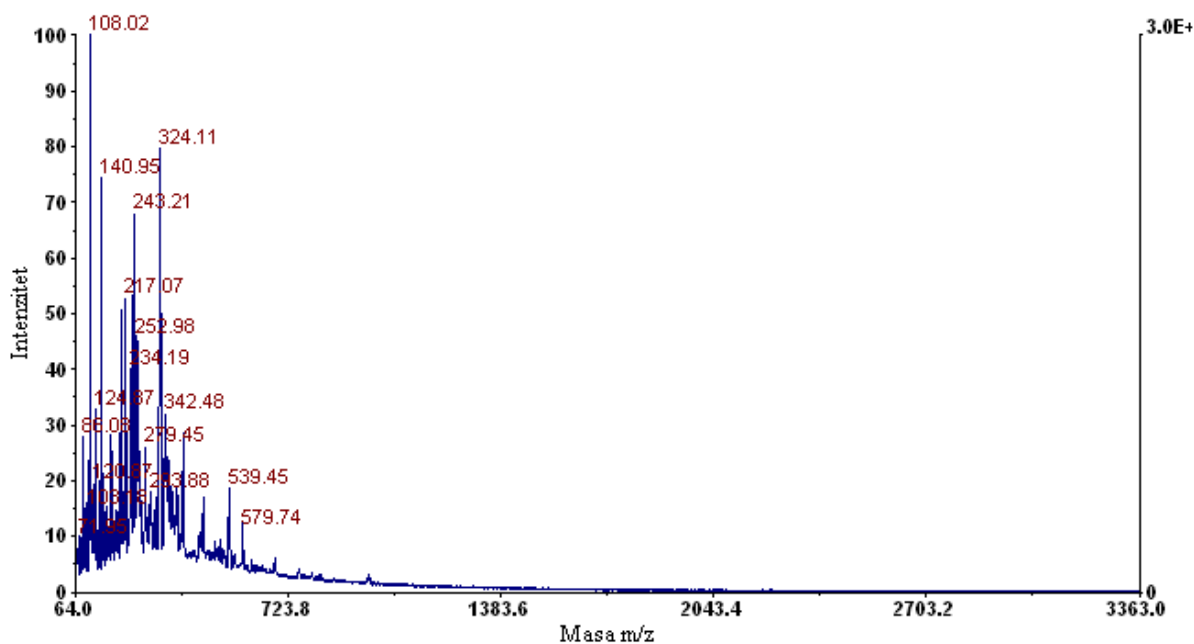
Slika 27. Eksperimentalni (gore) i teorijski (dole) maseni spektar za klaster od devet atoma srebra, Ag_9^+ . Eksperimentalno dobijeni maseni spektar za Ag_9^+ predstavlja uvećani deo spektra sa slike 26.

U maseno spektrometrijskoj analizi negativnih jona klastera srebra korišćeni su i CHCA i DHB matriks. Broj pikova koji se javlja u spektru negativnih jona je manji nego u spektru pozitivnih jona. Korišćenje CHCA matriksa kao rezultat nije dalo spektre zadovoljavajućeg kvaliteta i stoga je za analizu negativnih jona korišćen DHB matriks, što je kao rezultat dalo spektar prikazan na slici 28. U spektru negativnih jona uočava se prisustvo Ag_2 i Ag_3 klastera (slika 28). Prisustvo Ag_3 klastera je uočeno i u spektru pozitivnih jona.



Slika 28. MALDI TOF spektar anjona klastera srebra. Korišćen je DHB matiks.

Da bismo pokazali da do nastanka klastera srebra koji su detektovani masenospektrometrijski nije došlo laserskom desorpcijom uzorka unetog u MALDI sistem, za šta prema literaturnim podacima postoji mogućnost [176, 177], već γ -zračenjem, izvršena je i MALDI TOF analiza AgNO_3 i AgNO_3/PVA , korišćenjem CHCA matriksa. Analiza je pokazala prisustvo Ag pozitivnih jona, kao što je i očekivano. Za razliku od MALDI TOF spektra prikazanog na slici 26, gde su detektovani klasteri srebra koji sadrže 3-29 atoma srebra, MALDI TOF analiza $\text{AgNO}_3/\text{CHCA}$ je pokazala prisustvo samo Ag_2 i Ag_3 klastera, što potvrđuje da su gore detektovani klasteri nastali gama zračenjem. Ovo ujedno potvrđuje i stabilnost klastera srebra kojim su funkcionalizovane CNT i samim tim i stabilnost radiolitički dobijenih funkcionalizovanih materijala na bazi ugljeničnih nanocevi. Spektar pozitivnih jona nastalih analizom sistema $\text{AgNO}_3/\text{CHCA}$ prikazan je na slici 29.

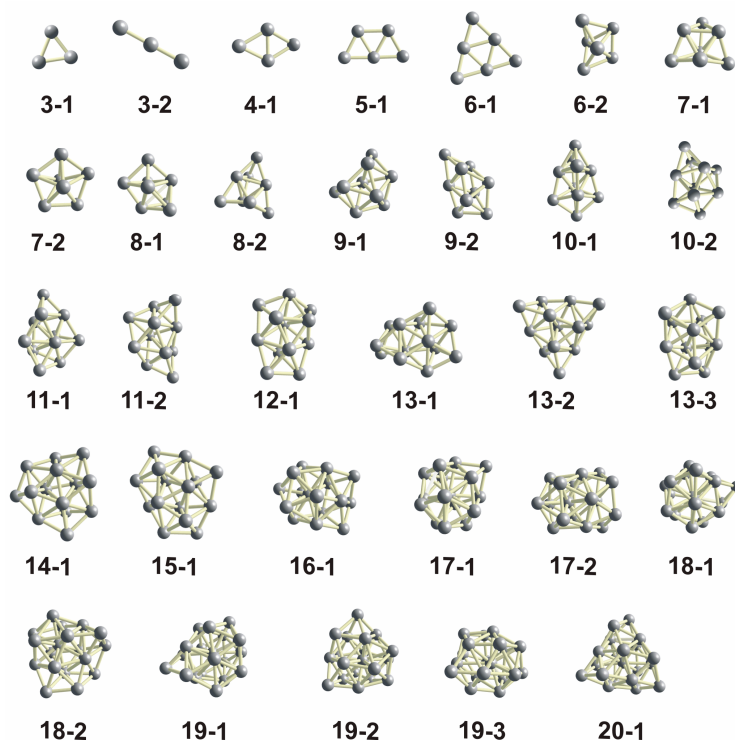


Slika 29. MALDI TOF spektar $\text{AgNO}_3/\text{CHCA}$.

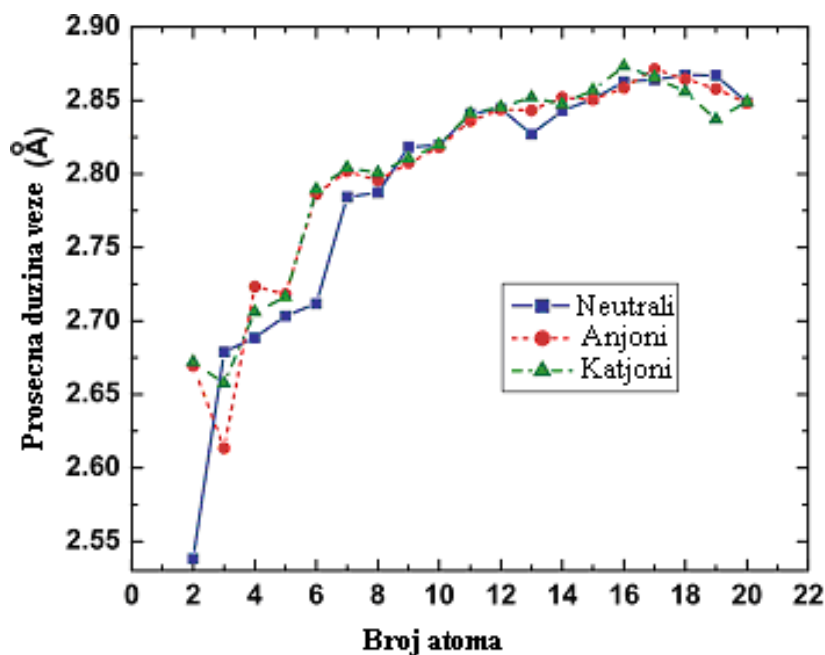
IV.2.1.1. Teorijska izračunavanja

Za izvođenje *ab initio* izračunavanja korišćen je SIESTA kod [178] za rešavanje standardnih Kon-Šamovih jednačina [179] koristeći bazisni set numeričkih atomskih orbitala.

Dobijene ravnotežne geometrije izomera Ag_n najniže energije, za $3 \leq n \leq 20$ prikazane su na slici 30. Slika 31 prikazuje prosečne dužine veza izomera najniže energije u zavisnosti od broja atoma. Dobijene ravnotežne geometrije i prosečne dužine veza su u dobroj saglasnosti sa ranijim izračunavanjima za Ag_n klustere sa do 14 atoma [180, 181] i klaster Ag_{20} [180]. Za Ag_n klustere sa vrednostima $15 \leq n < 20$, za koje nisu nađeni literaturni podaci proračuna baziranih na prvim principima, u ovom radu proračunima su dobijene ravnotežne geometrije. Prelaz sa 2D na 3D geometriju za srebrne klustere javlja se za $n \geq 6$.



Slika 30. Ravnotežne geometrije izomera klastera srebra Ag_n najniže energije, za $3 \leq n \leq 20$.



Slika 31. Prosečne dužine veza (Å) izomera najniže energije za neutralne, anjonske i katjonske klasterne srebra.

Vezivna energija E_b klastera Ag_n^m sa n atoma i naelektrisanjem $m=0, \pm 1$, i ukupnom energijom $E(Ag_n^m)$ je računata korišćenjem formule [180]:

$$E_b(Ag_n^m) = (n - 1)E(Ag_1) + E(Ag_1^m) - E(Ag_n^m) \quad (4.10)$$

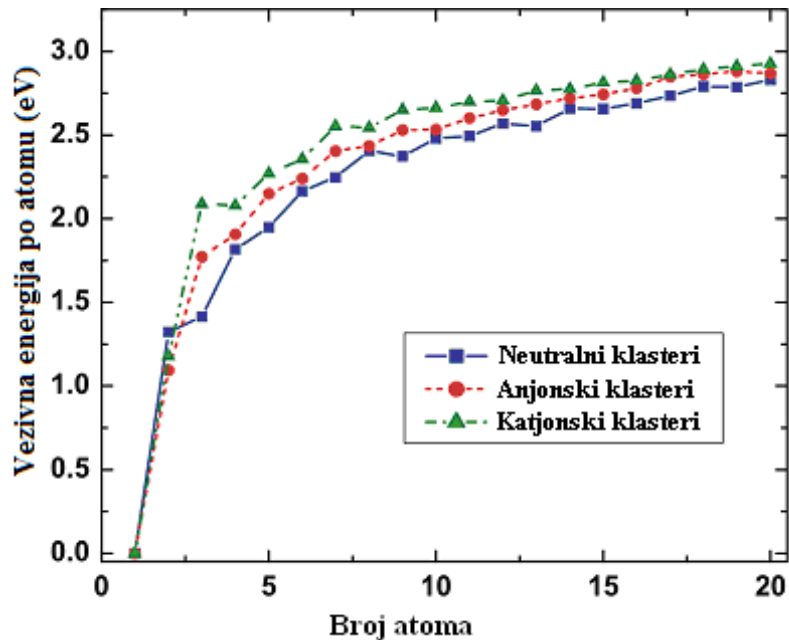
gde je n broj atoma, $E(Ag_1)$ ukupna energija neutralnog klastera sa jednim atomom, $E(Ag_1^m)$ ukupna energija klastera sa jednim atomom i naelektrisanjem m , a $E(Ag_n^m)$ ukupna energija klastera sa n atoma i naelektrisanjem m .

Na slici 32 su prikazane izračunate vezivne energije po atomu (za neutralne i naelektrisane klasterne srebra Ag_n^m ($m = -1, 0, 1$; $n \leq 20$)) u zavisnosti od broja atoma. Osim efekta par-nepar, može se uočiti i nešto veća stabilnost klastera kod kojih je $n = 6 + m$. Mnogo jasnija slika ekstra stabilnosti određenih klastera se dobija na osnovu pikova drugog diferencijala ukupne energije klastera, definisanog kao [180]:

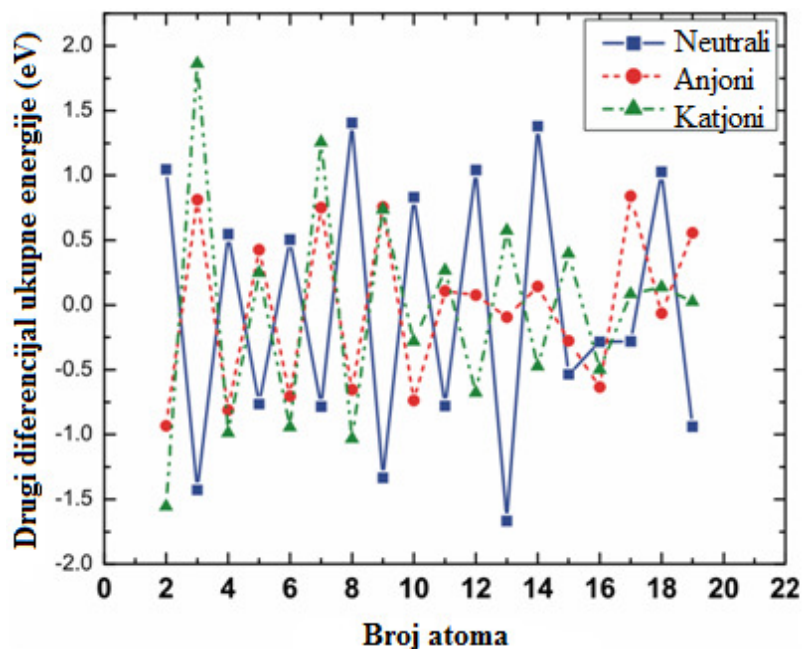
$$\Delta_2(Ag_n^m) = E(Ag_{n-1}^m) + E(Ag_{n+1}^m) - 2E(Ag_n^m) \quad (4.11)$$

gde je $E(Ag_{n-1}^m)$ ukupna energija klastera sa $n-1$ atomom i naelektrisanjem m , $E(Ag_{n+1}^m)$ ukupna energija klastera sa $n+1$ atomom i naelektrisanjem m , a $E(Ag_n^m)$ ukupna energija klastera sa n atoma i naelektrisanjem m .

Zavisnost vrednosti drugog diferencijala ukupne energije klastera od broja atoma u klasteru predstavljena je na slici 33. Ovako dobijene informacije o stabilnosti određenih klastera se dovode u vezu sa informacijama dobijenim eksperimentalnim putem, a posmatranjem pikova u masenim spektrima analiziranih klastera srebra. Sa slike 33 se vidi da su posebno stabilni neutralni klasteri Ag_8 i Ag_{14} . Stabilni anjonski klasteri su Ag_3 , Ag_9 i Ag_{17} , dok su za katjone to Ag_3 i Ag_7 . Ovi rezultati dobijeni teorijskim izračunavanjem su u delimičnoj saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim rezultatima koji su pokazali da su najstabilniji katjonski klasteri srebra oni koji sadrže 3, 7 i 9 atoma, a anjonski klasteri oni koji sadrže 3 atoma.



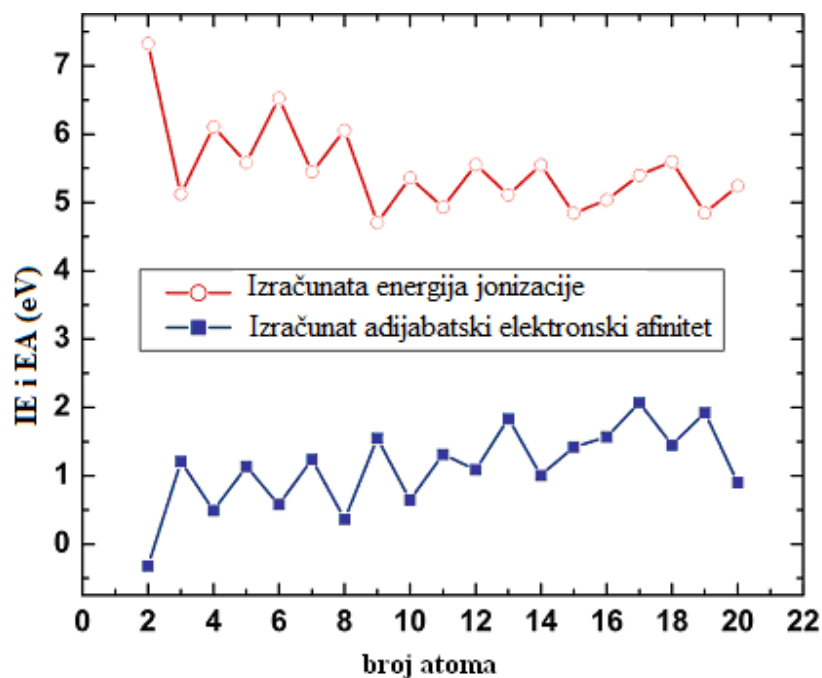
Slika 32. Izračunate vezivne energije po atomu neutralnih i naelektrisanih klastera srebra u zavisnosti od broja atoma.



Slika 33. Drugi diferencijal ukupne energije klastera u zavisnosti od broja atoma za neutralne i naelektrisane klasterne srebra.

Energije potrebne da bi se jonizovao neutralan klaster dodatkom ili gubitkom elektrona spadaju u fundamentalna svojstva klastera i definisane su elektronskim afinitetom (EA) i energijom jonizacije (IE). Rezultati za energije jonizacije i elektronske afinitete, koji su izračunati kao razlika energija neutralnih i jonskih klastera, a za različite klasterne srebra, prikazani su na slici 34. Uočava se oscilatorno ponašanje dobijenih vrednosti koje se ogleda u većim vrednostima IE za klasterne sa parnim brojem atoma i većim vrednostima EA za klasterne sa neparnim brojem atoma. Osim očekivanih oscilacija u vrednostima koje se javljaju kod klastera sa parnim odnosno neparnim brojem atoma srebra u klasteru, na slici 34 se uočavaju izraženi pikovi EA za klasterne $n = 17$, $n = 9$ i $n = 19$, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim na slici 33, gde se uočava izražena stabilnost anjona Ag_{17} , Ag_9 i Ag_{19} . Za klaster $n = 13$ se takodje uočava izražen pik vrednosti EA, ali u slučaju ovog klastera nije uočeno slaganje sa rezultatima na slici 33.

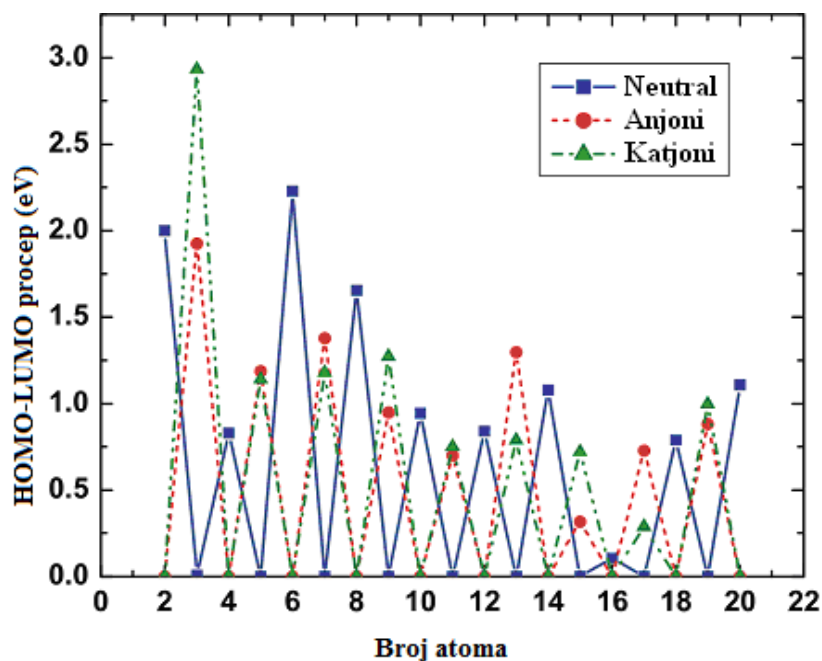
Posmatranjem zavisnosti vrednosti IE od broja atoma u klasteru (slika 34) uočavaju se izraženo niske vrednosti IE za klustere kod kojih je $n = 9$ i $n = 3$, a što je u saglasnosti sa rezultatima sa slike 33 koji govore o stabilnosti katjona navedenih klastera.



Slika 34. Izračunate energije jonizacije (IE) i elektronski afiniteti (EA) različitih malih klastera srebra Ag_n ($n \leq 20$).

HOMO – LUMO procepi (HOMO - najviša okupirana molekulska orbitala, LUMO - najniža neokupirana molekulska orbitala) izomera najniže energije neutralnih, anjonskih i katjonskih Ag klastera prikazani su na slici 35. I kod HOMO-LUMO procepa se uočavaju par-nepar oscilacije u vrednostima, te se veći HOMO-LUMO razmaci javljaju za neutralne Ag_n klustere sa parnim brojem atoma i naelektrisane Ag_n^\pm klustere sa neparnim brojem atoma. Uočava se da je dobijen pik za neutralni heksamer (Ag_6), a najrelevantniji pikovi za katjonske i anjonske klustere srebra su za $n = 3, 9$ i $n = 3, 7$, respektivno. Ovi rezultati,

zajedno sa eksperimentalnim, upućuju na vezu između velikih HOMO-LUMO procepa i povećane stabilnosti odgovarajućeg klastera.



Slika 35. HOMO – LUMO procepi izomera najniže energije neutralnih, anjonskih i katjonskih Ag klastera.

Analizirajući klastere srebra koji su funkcionalizovali ugljenične nanocevi, jasno se uočava postojanje neparno-parne "šeme", odnosno postojanje određenih magičnih brojeva, kako posmatranjem jonskih intenziteta u masenom spektru klastera srebra tako i posmatranjem vezivnih energija, energija jonizacije, elektronskih afiniteta i HOMO LUMO procepa.

U masenim spektrima se uočava postojanje pikova nakon kojih dolazi do pada intenziteta narednog pika u spektru. Objašnjenje ove pojave, odnosno postojanja takozvanih "magičnih brojeva", leži u Jellium modelu [182-185] u kom je stabilnost klastera određena energetskim nivoima valentnih elektrona vezanih u klasteru. Obzirom da je elektronska konfiguracija srebra slična onoj koju imaju alkalni klasteri a gde se jellium model uspešno primenjuje, to se ovaj model može primeniti i na klastere srebra. Klasteri koji imaju paran

broj valentnih elektrona imaju veću stabilnost zahvaljujući sparivanju spinova nego oni klasteri koji imaju neparan broj elektrona u ljusci. Za klastere sa magičnim brojevima broj atoma u klasteru odgovara broju elektrona koji su potrebni da bi došlo do zatvaranja ljuske u modelu elektronskih ljuski. Tako se na primer neutralni Ag_n klasteri sa $n = 6, 8, 14$ mogu smatrati klasterima magičnog broja sa elektronskim konfiguracijama zatvorenih ljuski. Ovi klasteri imaju veće vezivne energije po atomu, veće energije jonizacije, manje elektronske afinitete i veće HOMO LUMO procepe u poređenju sa susednim klasterima.

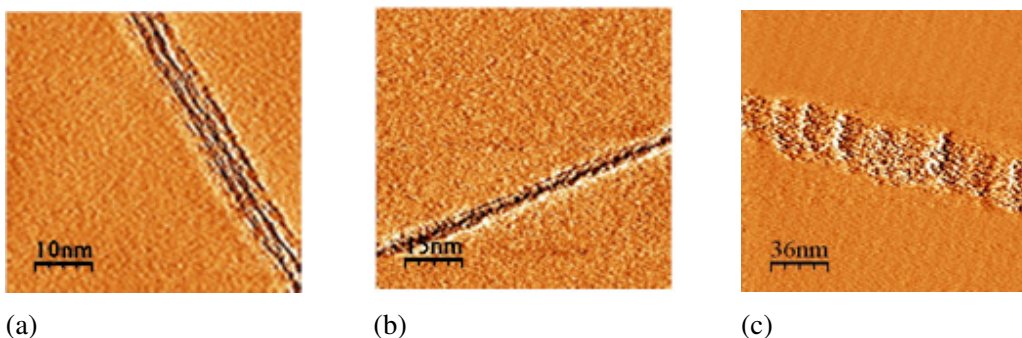
Sa druge strane klasteri srebra koji imaju neparan broj atoma će se lakše jonizovati kako dodatkom elektrona (imaju relativno velike vrednosti elektronskih afiniteta) tako i gubitkom elektrona (imaju relativno male vrednosti energija jonizacije). Kod jonskih klastera kao magični brojevi se javljaju Ag_3^+ i Ag_9^+ koji imaju 2 i 8 valentnih elektrona respektivno. Ovi klasteri odgovaraju zatvaranju prve i druge ljuske.

Ispitivanje radiolitički sintetisanih klastera srebra je dakle pokazalo da su klasteri kojima odgovaraju pikovi najvećeg intenziteta u masenim spektrima, odnosno klasteri najveće stabilnosti, mali klasteri sa neparnim brojem atoma, što je potvrđeno i teorijskim izračunavanjima. Rezultati dobijeni eksperimentalno i teorijskim izračunavanjima koji govore o stabilnosti i magičnim brojevima klastera srebra su u saglasnosti sa literaturnim podacima [177, 180, 181].

IV.3. Genotoksičnost ugljeničnih nanocevi

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja genotoksičnog uticaja SWCNT, MWCNT i amid-funkcionalizovanih SWCNT citokinezis-blok mikronukleusnim testom (CBMN) na humanim limfocitima i analizom γ -H2AX fokusa, čime je kvantifikovan broj dvolančanih prekida DNK u humanim fibroblastima.

Ugljenične nanocevi čiji je genotoksični uticaj ispitivan, okarakterisane su mikroskopski, korišćenjem STM mikroskopije. STM slike su prikazane na slikama 36(a), 36(b) i 36(c).



Slika 36. STM slike ugljeničnih nanocevi. (a) slika (52nm x 52nm) MWCNT, (b) slika (76nm x 76nm) SWCNT, (c) slika (180nm x 180nm) amid-funkcionalizovanih SWCNT.

Merenjem zeta potencijala uzoraka nanocevi, pokazano je da na pH 8,5 vrednost zeta potencijala za uzorak MWCNT (u medijumu limfocitne kulture) iznosi -14,8 mV, a zeta potencijal za uzorak amid-funkcionalizovanih SWCNT (u medijumu limfocitne kulture) iznosi -13,8 mV. Uočava se da su ugljenične nanocevi u ovim uzorcima negativno naelektrisane, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [186].

Rezultati CBMN testa u uzorcima tretiranim različitim koncentracijama SWCNT, MWCNT i amid-funkcionalizovanim SWCNT su prikazani u tabeli 1, tabeli 2 i na slikama 37, 38, 39 i 40.

Citostatski efekti strukture i koncentracije CNT na humane limfocite periferne krvi određen je izračunavanjem citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI). Dobijene

vrednosti su prikazane u tabeli 1 i na slici 37, kao zavisnost CBPI od koncentracije CNT, a za različite tipove nanocevi.

Promena učestalosti pojave biomarkera oštećenja DNK omogućuje praćenje genotoksičnog efekta. Rezultati koji prikazuju zavisnost učestalosti mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija (MN/1000BN), zavisnost učestalosti nukleoplazmatičnih mostova na 1000 binukleusnih ćelija (NPB/1000BN) i zavisnost učestalosti pupljenja jedra na 1000 binukleusnih ćelija (NBUD/1000BN) od koncentracije nanocevi prikazani su u tabeli 2 i na slikama 38, 39 i 40.

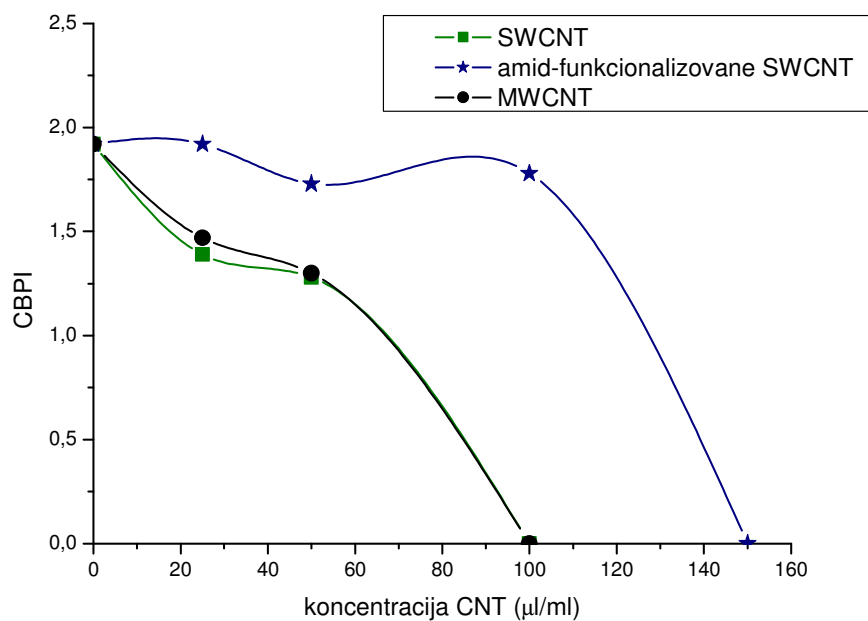
Učestalosti γ -H2AX fokusa u tretiranim i kontrolnim prikazane su u tabeli 3.

Tabela 1: Proliferativni indeks (CBPI) kulture limfocita tretiranih različitim koncentracijama SWCNT, amid-funkcionalizovanih SWCNT i MWNT.

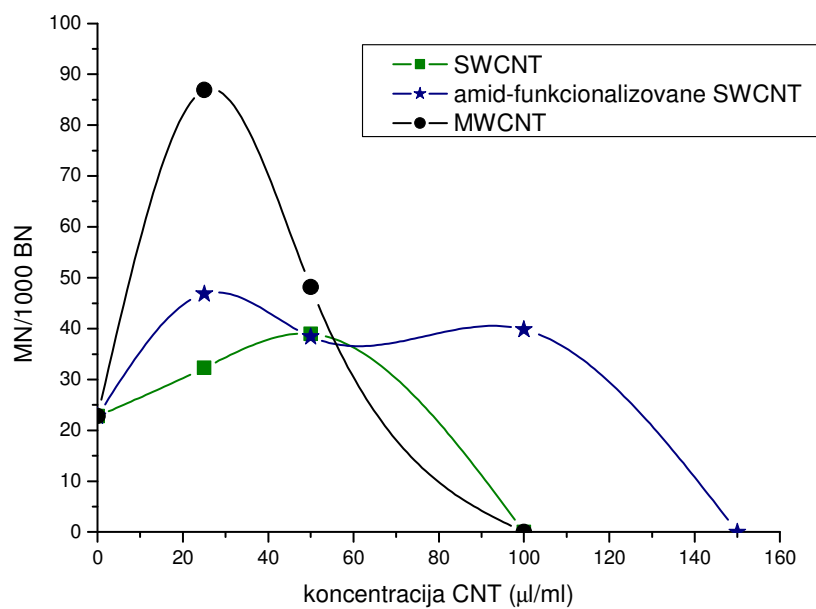
	Konc. CNT (µl/ml)	Broj binukleusnih ćelija (BN)	Broj mononukleusnih ćelija	Broj polinukleusnih ćelija	Ukupan broj ćelija	CBPI
Kontrola	0	1010	500	352	1862	1,92
SWNT	25	1022	1922	82	3026	1,39
	50	1027	2823	21	3871	1,28
	100	/	234	/	/	Toksična doza
amid-funkc. SWNT	25	1046	507	351	1904	1,92
	50	1068	853	255	2176	1,73
	100	1030	823	335	2188	1,78
	150	/	258	/	/	Toksična doza
MWNT	25	1024	1670	149	2843	1,47
	50	1059	3186	129	4374	1,30
	100	/	380	/	/	Toksična doza

Tabela 2: Učestalosti mikronukleusa (MN), nukleoplazmatičnih mostova (NPB) i pupljenja jedara (NBUD) na 1000 binukleusnih ćelija (BN).

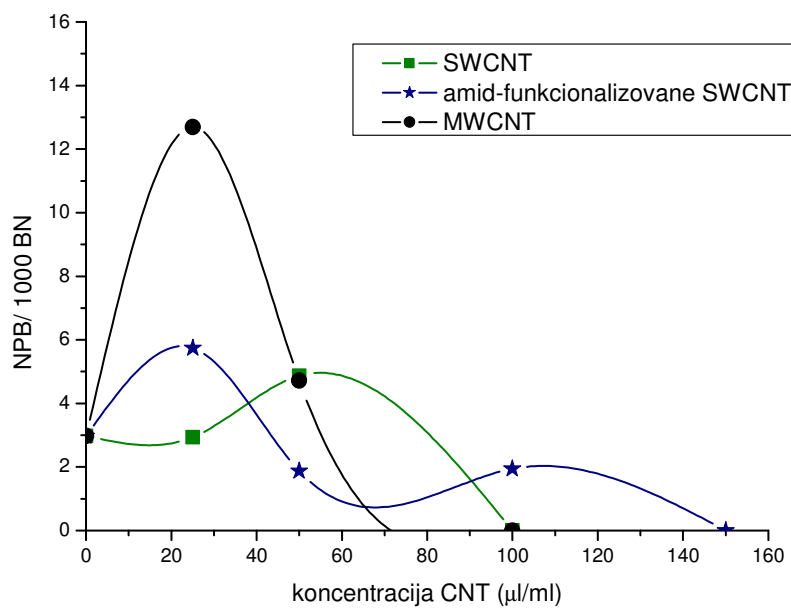
	Konc. CNT (μL/ml)	Broj BN ćelija	Broj BN ćelija bez MN	Broj BN ćelija sa MN	Ukupno MN	Broj BN ćelija sa NPB	Broj BN ćelija sa NBUD	MN/1000 BN ćelija	NPB/1000 BN ćelija	NBUD/1000 BN ćelija
Kontrola	0	1010	980	19	23	3	8	22,77	2,97	7,92
SWNT	25	1022	987	23	33	3	9	32,29	2,94	8,81
	50	1027	970	31	40	5	21	38,95	4,87	20,45
	100	/	/	/	/	/	/	/	/	/
amid-funkc. SWNT	25	1046	971	40	49	6	29	46,84	5,74	27,72
	50	1068	1004	33	41	2	29	38,38	1,87	27,15
	100	1030	981	26	41	2	21	39,80	1,94	20,39
	150	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MWNT	25	1024	944	63	89	13	4	86,91	12,69	3,91
	50	1059	1006	38	51	5	10	48,16	4,72	9,44
	100	/	/	/	/	/	/	/	/	/



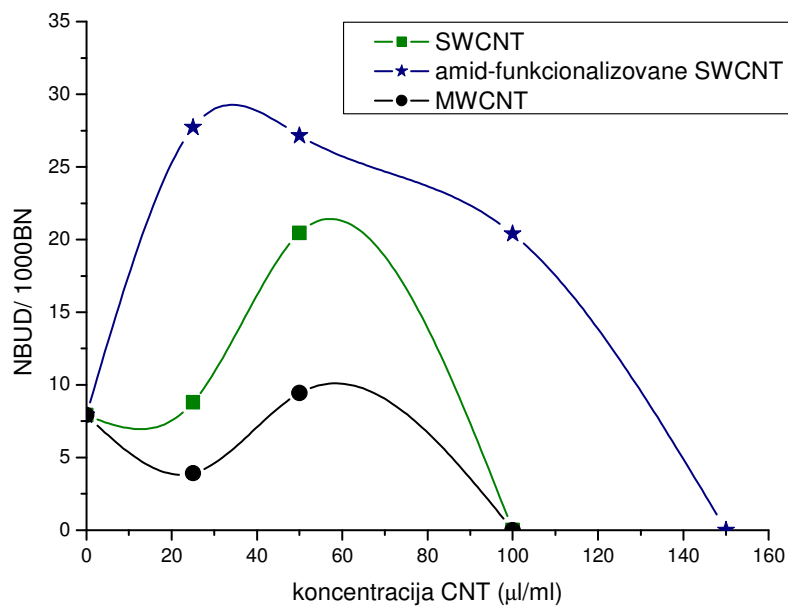
Slika 37. Zavisnost proliferativnog indeksa (CBPI) od koncentracije CNT



Slika 38. Učestalost mikronukleusa u zavisnosti od koncentracije CNT



Slika 39. Zavisnost učestalosti NPB od koncentracije CNT



Slika 40. Zavisnost NBUD/1000 BN od koncentracije CNT

Tabela 3: Učestalost γ -H2AX fokusa u humanim fibroblastima pre i nakon tretmana ugljeničnim nanocevima (SWCNT, amid-funkcionalizovanim SWCNT i MWCNT).

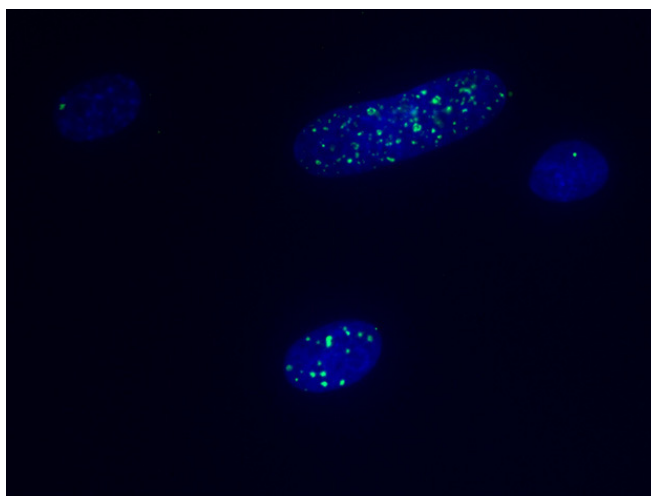
	Broj analiziranih ćelija	Srednja vrednost γ H2AX fokusa po ćeliji	Minimum	Maksimum
Kontrola	338	3,44±0,23	0	60
SWCNT	306	9,49±1,32	0	69
amid-funkcionalizovane SWCNT	216	10,94±1,49	0	60
MWCNT	332	10,50±0,83	0	60

Tretiranje humanih limfocita sa SWCNT (koncentracije 25 μ l/ml i 50 μ l/ml) je pokazalo da one utiču na povećanje učestalosti mikronukleusa od preko 40% u poređenju sa kontrolom, a da je taj efekat najmanji u poređenju sa amid-funkcionalizovanim SWCNT i MWCNT. Pri koncentraciji od 50 μ l/ml SWCNT dostižu svoj maksimalni efekat, kako na indukciju MN tako i na učestalost nukleoplazmatičnih mostova i pupljenje jedra. Primenjene koncentracije SWCNT značajno smanjuju proliferacioni potencijal ćelija (CBPI ima 30% manju vrednost u odnosu na kontrolni uzorak), odnosno značajno usporavaju proliferaciju limfocita. Statistička analiza je pokazala statistički značajnu inverznu korelaciju između MN i CBPI. U humanim fibroblastima primenjene koncentracije SWCNT značajno povećavaju broj dvolančanih prekida DNK, 2,7 puta više u odnosu na kontrolu (slika 41).

Amid-funkcionalizovane SWCNT indukuju MN statistički značajno na svim primenjenim koncentracijama. Pri koncentraciji od 25 μ l/ml je zapažena maksimalna indukcija MN, a taj efekat je dva puta veći u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, amid-funkcionalizovane SWCNT ne remete značajno proliferacioni potencijal ćelija u kulturi. Naime, pri najmanjoj koncentraciji od 25 μ l/ml vrednost proliferativnog indeksa se ne menja u odnosu na kontrolu. Povećanjem koncentracije amid-funkcionalizovanih SWCNT dolazi do promene vrednosti CBPI, ali se čak i pri koncentraciji od 100 μ l/ml, što za

SWCNT i MWCNT predstavlja toksičnu dozu, proliferativni indeks ne menja bitnije u odnosu na niže koncentracije. Dakle, indukcija MN nije praćena promenama proliferacionog potencijala. U fibroblastima amid-funkcionalizovane SWCNT indukuju γ -H2AX fokuse (dvolančane prekide DNK) 3,18 puta više u odnosu na kontrolne netretirane fibroblaste. Incidenca γ -H2AX fokusa u fibroblastima pozitivno koreliše sa incidencom MN u limfocitima.

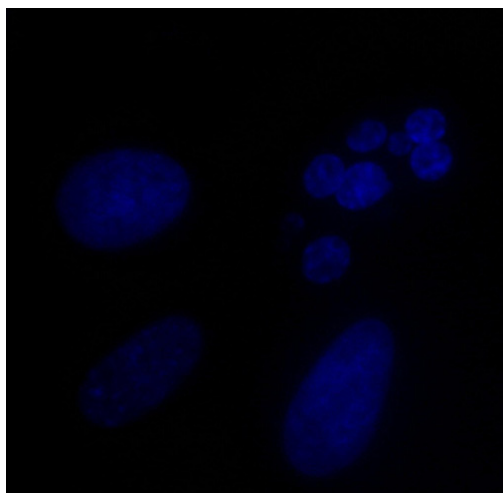
Indukcija MN je najizraženija kod kultura tretiranih MWCNT. Maksimalni efekat se uočava pri koncentraciji MWCNT od 25 μ l/ml i veći je 3,8 puta u odnosu na kontrolu. Pored indukcije MN, MWCNT imaju najizraženiji uticaj i na indukciju nukleoplazmatičnih mostova. Primenjene koncentracije MWCNT dovode do značajnog pada proliferacionog potencijala ćelija. U kulturi fibroblasta MWCNT značajno povećavaju broj γ -H2AX fokusa u odnosu na kontrolu, ali su ove vrednosti slične kao kod SWCNT.



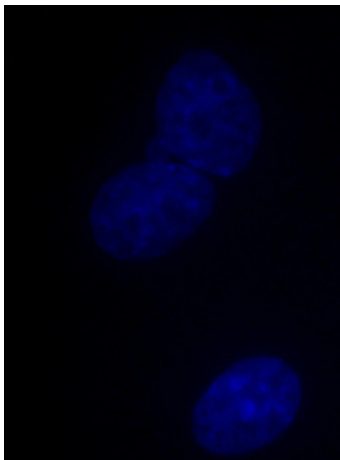
Slika 41. γ H2AX fokusi indukovani SWCNT (zelene tačke).

Rezultati pokazuju da je kod uzoraka tretiranih SWCNT učestalost indukovanih γ -H2AX fokusa mnogo veća nego što to učestalost MN pokazuje, što ukazuje da je deo indukovanih dvolančanih prekida uspešno popravljen. Pored toga, uočena apoptotska tela u fibroblastima (slika 42) tretiranim SWCNT ukazuju da je deo ćelija iz G1/S faze ćelijskog ciklusa ušao u apoptozu. SWCNT indukuju nastanak mikronukleusa i nukleoplazmatičnih

mostova između nukleusa (slika 43), što je posledica neuspele popravke indukovanih dvolančanih prekida. Mehanizam koji se nalazi u osnovi nastanka dvolančanih prekida DNK, a pod uticajem SWCNT je nepoznat, ali se pretpostavlja da je indukovano negativnim naelektrisanjem SWCNT. Negativno naelektrisani molekuli mogu da remete membransku i genomsku stabilnost. Dakle, korišćene SWCNT su pokazale genotoksična svojstva koja se ogledaju u inhibiciji proliferacije limfocita, indukciji dvolančanih prekida, mikronukleusa, nukleoplazmatičnih mostova, pupljenja jedra i na kraju apoptozi [187]. Mnogi radovi se bave hidrofobnom prirodom SWCNT i njihovim ponašanjem u biološkim sistemima. Korišćenjem AFM mikroskopije i praćenjem direktnog kontakta između ćelijske membrane i SWCNT dispergovanih u vodi pokazano je da se SWCNT talože i selektivno deponuju na membranu [188], menjajući membransku stabilnost, ćelijsku signalizaciju i genomsku stabilnost. Pokazana genotoksična svojstva SWCNT mogu se pripisati i samoj strukturi SWCNT i snopovima u kojima se javljaju, njihovim karakteristikama i hemijskoj nestabilnosti u ćelijskoj kulturi. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji potvrđuju citotoksičnost i oksidativni stres indukovano ugljeničnim nanocevima [131, 132, 189].



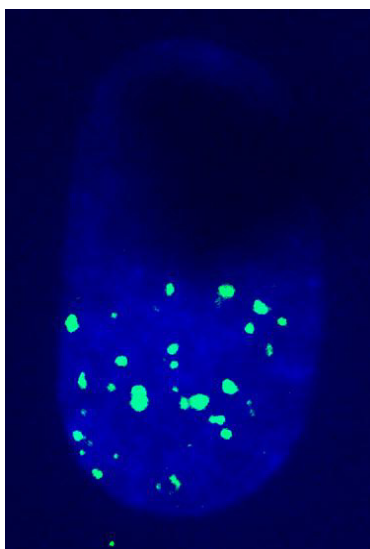
Slika 42. Apoptotska tela u fibroblastima tretiranim SWCNT.



Slika 43. Nukleoplazmatični most koji povezuje dva nukleusa (gornja binukleusna ćelija)

Nasuprot nefunkcionalizovanim SWCNT, funkcionalizovane nanocevi pokazuju manju citotoksičnost [140, 190]. Dai i saradnici su sjedinjavali različite biološke molekule i funkcionalizovane SWCNT i formirali suspenzije visoke stabilnosti u vodenim rastvorima uključujući i fiziološke pufere [191, 192]. Pokazano je da je citotoksični odgovor ćelija u kulturi zavisao od stepena funkcionalizacije SWCNT. Povećanje stepena funkcionalizacije bočnih zidova SWCNT rezultuje manjom toksičnošću [188, 193]. Osim ovoga, autori su pokazali i da su SWCNT sa funkcionalizovanim bočnim zidovima znatno manje citotoksične od SWCNT stabilizovanih surfaktantima. Amid funkcionalizovane SWCNT koje su ispitivane zaista i pokazuju manji stepen citotoksičnosti. One ne remete proliferacioni potencijal limfocita ali indukuju mikronukleuse u većem stepenu nego SWCNT. U poređenju sa drugim ispitivanim CNT, indukuju najviše pupljenja jedra, što se može smatrati početnim genotoksičnim efektom. U fibroblastima amid funkcionalizovane SWCNT indukuju formiranje γ -H2AX fokusa 3,18 puta više u odnosu na kontrolu. Indukcija γ -H2AX fokusa u fibroblastima je u pozitivnoj korelaciji sa indukcijom mikronukleusa u limfocitima, što ukazuje na klastogeno dejstvo. Ovo je verovatno posledica same proizvodnje nanocevi. Većina uzoraka nanocevi koje se koriste u biomedicinskim istraživanjima su smeše nanocevi različitih dužina, prečnika i hiralnosti. Sama dužina nanocevi može da utiče na *in vitro* unos u ćeliju. Amid funkcionalizovane SWCNT korišćene u ovim eksperimentima nemaju usku raspodelu dužina. Pod

mikroskopom su uočeni mali agregati (slika 44) koji ukazuju da interakcija sa serumom menja rastvorljivost i indukuje taloženje CNT. Ovo vodi zaključku da ispitivane amid funkcionalizove SWCNT ne mogu kao takve biti korišćene u biomedicini.



Slika 44. Funkcionalizovane SWCNT istaložene na jedrima (crna senka): indukovani γ -H2AX fokusi se uočavaju ispod senke kao svetlo zelene tačke.

MWCNT pokazuju klastogena svojstva koja se ogledaju u najizraženijoj indukciji mikronukleusa i nukleoplazmatičnih mostova. Učestalost indukovanih γ -H2AX fokusa nije bila onolika kolika je očekivana na osnovu mikronukleus testa, što ukazuje na to da se MWCNT ponašaju istovremeno kao klastogeni i aneugeni agens. Čitav spektar bioloških efekata koji pokazuju MWCNT svakako može biti pripisan njihovoj sirovoj strukturi i pravljenju svežnjeva.

V ZAKLJUČAK

Prečišćavanje ugljeničnih nanocevi je vršeno tretiranjem uzoraka kiselinom, čemu je prethodilo žarenje, i tretiranjem polimerom. Nakon žarenja na 600°C, kiselinom su paralelno tretirana dva uzorka, jedan je tretiran 6 M HCl u ultrazvučnom kupatilu, a drugi 12 M HCl ali bez tretiranja u ultrazvučnom kupatilu. Pokazano je da primena ultrazvuka ima uticaja na tretirani materijal, jer se korišćenjem slabije kiseline uz primenu ultrazvuka kao rezultat dobijaju MWCNT koje su mnogo bolje dispergovane u kiselini nego kada se za prečišćavanje koristi jača kiselina. Sa druge strane, poređenjem rezultata prečišćavanja nanocevi kiselinom i polimerom PmPV dolazi se do zaključka da prečišćavanje polimerom ima veći prinos prečišćavanja nego prečišćavanje kiselinom, a uz to prečišćavanje polimerom predstavlja nedestruktivni način prečišćavanja koji kao rezultat daje MWCNT uniformnijih prečnika.

Jednostruke i višestruke ugljenične nanocevi su funkcionalizovane klasterima srebra korišćenjem nove, jednostavne, jednostepene metode funkcionalizacije gama zračenjem uz pomoć polimera PVA. Ispitana su dva različita puta funkcionalizacije uz pomoć gama zračenja, a u zavisnosti od redukcionne sposobnosti različitih redukcionih vrsta nastalih γ -zračenjem. Tako su analizirani sistemi Ag/PVA/SWCNT i Ag/PVA/MWCNT koji su sintetisani pomoću hidratisanih elektrona i PVA \cdot ili sintetisani samo pomoću PVA \cdot radikala. Pokazano je da nastali klasteri srebra, prečnika od nekoliko nm do 30 nm, uspešno funkcionalizuju ugljenične nanocevi, a da je funkcionalizacija bolja kada se odvija samo sa PVA \cdot radikalima kao redukujućom vrstom, kako za SWCNT, tako i za MWCNT. Osim što su ugljenične nanocevi uspešno funkcionalizovane klasterima srebra i što je napravljeno poređenje uticaja različitih redukujućih vrsta na funkcionalizaciju, po prvi put su za sintezu i disperziju klastera srebra na površini CNT a primenom metode γ -zračenja korišćeni samo PVA \cdot radikali.

Masenospektrometrijska analiza strukture i stabilnosti klastera srebra kojim su funkcionalizovane SWCNT i MWCNT, potvrdila je stabilnost ovih klastera. Potvrđeno je prisustvo klastera srebra koji sadrže 3 do 29 atoma srebra i postojanje klastera "magičnih

brojeva". Najstabilniji klasteri, odnosno klasteri kojima odgovaraju pikovi najvećeg intenziteta u masenim spektrima su mali klasteri koji imaju neparan broj atoma, a što je potvrđeno i *ab initio* izračunavanjima. Masena spektrometrija je pokazala i da lasersko zračenje ne utiče na stvaranje Ag klastera koji imaju više od 3 atoma.

Ispitivanja genotoksičnosti ugljeničnih nanocevi su pokazala da korišćene nefunkcionalizovane SWCNT imaju genotoksične osobine koje se ogledaju u inhibiciji proliferacije limfocita, indukciji dvolančanih prekida, mikronukleusa i anafaznih mostova. Pokazano je da amid-funkcionalizovane SWCNT pokazuju manji stepen citotoksičnosti u odnosu na nefunkcionalizovane CNT jer ne remete proliferacioni potencijal limfocita, ali indukuju nastanak mikronukleusa u većem stepenu nego nefunkcionalizovane SWCNT. Među ispitivanim CNT, MWCNT imaju najizraženije klastogene efekte koji se ogledaju u najizraženijoj indukciji mikronukleusa i anafaznih mostova.

Pokazano je da korišćene metode i ćelijski sistemi mogu biti uspešno korišćeni za ispitivanje genotoksičnosti CNT. Pored toga, opšti je zaključak da funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi uspešno utiče na smanjivanje njihove toksičnosti i da kao pogodan materijal za primene u biomedicini predstavljaju ugljenične nanocevi uniformne dužine, prečnika i hiralnosti, čiju genotoksičnost nadalje treba ispitivati.

LITERATURA

- [1] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* **318** (1985) 162.
- [2] S. Iijima, *Nature* **354** (1991) 56.
- [3] S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* **363** (1993) 603.
- [4] D. S. Bethune, C. H. Kiang, M. S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, *Nature* **363** (1993) 605.
- [5] A. K. Geim, K. S. Novoselov, *Nat. Mater.* **6** (2007) 183.
- [6] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, *Carbon* **33** (1995) 883.
- [7] R. Saito, M. Fujita, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Appl. Phys. Lett.* **60** (1992) 2204.
- [8] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Eklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic, New York (1996).
- [9] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, J. C. Charlier, E. Hernandez, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **362** (2004) 2065.
- [10] P. M. Ajayan, *Chem. Rev.* **99** (1999) 1787.
- [11] A. Hirsch, O. Vostrowsky, *Top. Curr. Chem.* **245** (2005) 193.
- [12] M. J. M. Daenen et al. *The Wondrous World of Carbon Nanotubes*, Eindhoven University of Technology (2003).
- [13] A. Yasuda, N. Kawase, W. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 13294.
- [14] S. B. Sinnott, R. Andrews, D. Qian, A. M. Rao, Z. Mao, E. C. Dickey, F. Derbyshire, *Chem. Phys. Lett.* **315** (1999) 25.
- [15] T. W. Ebbesen, P. M. Ajayan, *Nature* **358** (1992) 220.
- [16] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, Ph. Avouris, *Carbon nanotubes Synthesis, Structure, Properties and Applications*, Springer (2001).

- [17] T. Guo, P. Nikolaev, A. Thess, D. Colbert, R. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* **243** (1995) 49.
- [18] M. Endo, K. Takeuchi, S. Igarashi, K. Kobori, M. Sjiiraishi, H. Kroto, *J. Phys. Chem. Solids* **54** (1993) 1841.
- [19] Z. F. Ren, Z. P. Huang, J. W. Xu, J. H. Wang, P. Bush, M. P. Siegel, P. N. Provencio, *Science* **282** (1998) 1105.
- [20] M. Yudasaka, R. Kikuchi, T. Matsui, Y. Ohki, S. Yoshimura, E. Ota, *Appl. Phys. Lett.* **67** (1995) 2477.
- [21] S. S. Wong, S. Banerjee, in *Functionalization of Nanotube Surfaces*, ed. J. A. Schwarz, C. I. Contescu, K. Putyera, Marcel Dekker Inc, New York (2004) 1251–1268.
- [22] S. Niyogi, M. A. Hamon, H. Hu, B. Zhao, P. Bhowmik, R. Sen, M. E. Itkis, R. C. Haddon, *Acc. Chem. Res.* **35** (2002) 1105.
- [23] E. Borowiak-Palen, T. Pichler, X. Liu, M. Knupfer, A. Graff, O. Jost, W. Pompe, R. J. Kalenczuk, J. Fink, *Chem. Phys. Lett.* **363** (2002) 567.
- [24] V. Datsyuk, M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis, C. Galiotis, *Carbon* **46** (2008) 833.
- [25] I. W. Chiang, B. E. Brinson, R. E. Smalley, J. L. Margrave, R. H. Hauge, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 1157.
- [26] J. M. Moon, K. H. An, Y. H. Lee, Y. S. Park, D. J. Bae, G. S. Park, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 5677.
- [27] V. Ivanov, A. Fonseca, J. B. Nagy, A. Lucas, P. Lambin, D. Bernaerts, X. B. Zhang, *Carbon* **33** (1995) 1727.
- [28] J. Liu, A. G. Rinzler, H. Dai, J. H. Hafner, R. K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y-S. Shon, T. R. Lee, D. T. Colbert, R. E. Smalley, *Science* **280** (1998) 1253.
- [29] P. X. Hou, C. Liu, Y. Tong, S. Xu, M. Liu, H. M. Cheng, *J. Mater. Res.* **16** (2001) 2526.
- [30] T. J. Park, S. Banerjee, T. H. Benny, S. S. Wong, *J. Mater. Chem.* **16** (2006) 141.
- [31] Shunji Bandow, A. M. Rao, K. A. Williams, A. Thess, R. E. Smalley, P. C. Eklund, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 8839.

- [32] I. W. Chiang, B. E. Brinson, A. Y. Huang, P. A. Willis, M. J. Bronikowski, J. L. Margrave, R. E. Smalley, R. H. Hauge, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 8297.
- [33] Z. Gu, H. Peng, R. H. Hauge, R. E. Smalley, J. L. Margrave, *Nano Lett.* **2** (2002) 1009.
- [34] E. Farkas, M. E. Anderson, Z. H. Chen, A. G. Rinzler, *Chem. Phys. Lett.* **363** (2002) 111.
- [35] S. Niyogi, H. Hu, M. A. Hamon, P. Bhowmik, B. Zhao, S. M. Rozenzhak, J. Chen, M. E. Itkis, M. S. Meier, R. C. Haddon, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 733.
- [36] M. Yang, V. Koutsos, M. Zaiser, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 10009.
- [37] A. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 1853.
- [38] D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, M. Prato, *Chem. Rev.* **106** (2006) 1105.
- [39] E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem.* **5** (2004) 1084.
- [40] Z. Guo, P. J. Sadler, S. C. Tsang, *Adv. Mater.* **10** (1998) 701.
- [41] A. V. Ellis, K. Vijayamohanan, R. Goswami, N. Chakrapani, L. S. Ramanathan, P. M. Ajayan, G. Ramanath, *Nano Lett.* **3** (2003) 279.
- [42] L. Jiang, L. Gao, *Carbon* **41** (2003) 2923.
- [43] J. Sun, L. Gao, M. Iwasa, *Chem. Commun.* (2004) 832.
- [44] A. Star, J. F. Stoddart, D. Steuerman, M. Diehl, A. Boukai, E. W. Wong, X. Yang, S.-W. Chung, H. Choi, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **113** (2001) 1771.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 1721.
- [45] J. N. Coleman, A. B. Dalton, S. Curran, A. Rubio, A. P. Davey, A. Drury, B. McCarthy, B. Lahr, P. M. Ajayan, S. Roth, R. C. Barklie, W. J. Blau, *Adv. Mater.* **12** (2000) 213.
- [46] M. O'Connell, P. Boul, L. Ericson, C. Huffman, Y. Wang, E. Haroz, C. Kuper, J. Tour, K. Ausman, R. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* **342** (2001) 265.
- [47] W. Han, S. Fan, Q. Li, Y. Hu, *Science* **277** (1997) 1287.
- [48] E. Dujardin, T. W. Ebbesen, A. Krishnan, M. M. J. Treacy, *Adv. Mater.* **10** (1998) 1472.
- [49] K. Matsui, B. K. Pradhan, T. Kyotani, A. Tomita, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 5682.

- [50] B. Smith, M. Monthieux, D. Luzzi, *Nature*, **396** (1998) 323.
- [51] K. Hirahara, S. Bandow, K. Suenaga, H. Kato, T. Okazaki, H. Shinohara, S. Iijima, *Phys. Rev. B* **64** (2001) 115420.
- [52] T. Okazaki, K. Suenaga, K. Hirahara, S. Bandow, S. Iijima, H. Shinohara, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 9673.
- [53] K. Hirahara, K. Suenaga, S. Bandow, H. Kato, T. Okazaki, H. Shinohara, S. Iijima, *Phys. Rev. Lett.* **85** (2000) 5384.
- [54] K. Suenaga, T. Okazaki, C. R. Wang, S. Bandow, H. Shinohara, S. Iijima, *Phys. Rev. Lett.* **90** (2003) 055506.
- [55] B. W. Smith, D. E. Luzzi, Y. Achiba, *Chem. Phys. Lett.* **331** (2000) 137.
- [56] S. Bandow, M. Takizawa, K. Hirahara, M. Yudasaka, S. Iijima, *Chem. Phys. Lett.* **337** (2001) 48.
- [57] J. J. Davis, M. L. H. Green, H. A. O. Hill, Y. C. Leung, P. J. Sadler, J. Sloan, A. V. Xavier, S. C. Tsang, *Inorg. Chim. Acta* **272** (1998) 261.
- [58] T. Ito, L. Sun, R. M. Crooks, *Chem. Commun.* (2003) 1482.
- [59] H. Gao, Y. Kong, D. Cui, C. S. Ozkan, *Nano Lett.* **3** (2003) 471.
- [60] E. T. Mickelson, C. B. Huffman, A. G. Rinzler, R. E. Smalley, R. H. Hauge, J. L. Margrave, *Chem. Phys. Lett.* **296** (1998) 188.
- [61] E. T. Mickelson, I.W. Chiang, J. L. Zimmerman, P. J. Boul, J. Lozano, J. Liu, R. E. Smalley, R. H. Hauge, J. L. Margrave, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 4318.
- [62] P. J. Boul, J. Liu, E. T. Mickelson, C. B. Huffman, L. M. Ericson, I. W. Chiang, K. A. Smith, D. T. Colbert, R. H. Hauge, J. L. Margrave, R. E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* **310** (1999) 367.
- [63] J. Chen, M. A. Hamon, H. Hu, Y. Chen, A. M. Rao, P. C. Eklund, R. C. Haddon, *Science* **282** (1998) 95.
- [64] M. Holzinger, O. Vostrowsky, A. Hirsch, F. Hennrich, M. Kappes, R. Weiss, F. Jellen, *Angew. Chem.* **113** (2001) 4132.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 4002.
- [65] S. Campidelli, C. Klumpp, A. Bianco, D. M. Guldi, M. Prato, *J. Phys. Org. Chem.* **19** (2006) 531.

- [66] E. Durgun, S. Dag, V. M. K. Bagci, O. Gülseren, T. Yildirim, S. Ciraci, *Phys. Rev. B* **67** (2003) 201401.
- [67] B. Xue, P. Chen, Q. Hong, J.Y. Lin, K. L. Tan, *J. Mater. Chem.* **11** (2001) 2378.
- [68] C. Gao, C. D. Vo, Y. Z. Jin, W. Li, S. P. Armes, *Macromolecules* **38** (2005) 8634.
- [69] T. M. Day, P. R. Unwin, N. R. Wilson, J. V. Macpherson, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 10639.
- [70] S. D. Oh, B. K. So, S. H. Choi, A. Gopalan, K. P. Lee, K. R. Yoon, I. S. Choi, *Mater. Lett.* **59** (2005) 1121.
- [71] M. C. Wu, C. L. Li, C. K. Hu, Y. C. Chang, Y. H. Liaw, L. W. Huang, C. S. Chang, T. T. Tsong, T. Hsu, *Phys. Rev. B* **74** (2006) 125424.
- [72] S. K. Choi, K.Y. Chun, S. B. Lee, *Diam. Relat. Mater.* **18** (2009) 637.
- [73] C. Gao, W. Li, Y. Z. Jin, H. Kong, *Nanotechnology* **17** (2006) 2882.
- [74] A. Zamudio, A. L. Elias, J. A. Rodriguez-Manzo, F. Lopez-Urias, G. Rodriguez-Gattorno, F. Lupo, M. Ruhle, D. J. Smith, H. Terrones, D. Diaz, M. Terrones, *Small* **2** (2006) 346.
- [75] Y. Liu, J. Tang, X. Chen, W. Chen, G. K. H. Pang, J. H. Xin, *Carbon* **44** (2006) 381.
- [76] G. W. Yang, G. Y. Gao, C. Wang, C. L. Xu, H. L. Li, *Carbon* **46** (2008) 747.
- [77] N. Tanaka, H. Nishikiori, S. Kubota, M. Endo, T. Fujii, *Carbon* **47** (2009) 2752.
- [78] Y. Lin, K. A. Watson, M. J. Fallbach, S. Ghose, J. G. Smith Jr., D. M. Delozier, W. Cao, R. E. Crooks, J. W. Connell, *ACS Nano* **3** (2009) 871.
- [79] D. Baskaran, J. W. Mays, M. S. Bratcher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 2138.
- [80] J. N. Coleman, U. Khan, W. J. Blau, Y. K. Gun'ko, *Carbon* **44** (2006) 1624.
- [81] K. Jiang, A. Eitan, L. S. Schadler, P. M. Ajayan, R. W. Siegel, *Nano Lett.* **3** (2003) 275.
- [82] H. Xu, X. Wang, Y. Zhang, S. Liu, *Chem. Mater.* **18** (2006) 2929.
- [83] K. R. Reddy, B. C. Sin, K. S. Ryu, J. C. Kim, H. Chung, Y. Lee, *Synthetic Met.* **159** (2009) 595.

- [84] A. Chapiro, *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*, Interscience Publishers, New York, (1962).
- [85] M. M. Nasef, *J. Appl. Polym. Sci.* **77** (2000) 1003.
- [86] C. S. Pande, N. Gupta, *J. Appl. Polym. Sci.* **71** (1999) 2163.
- [87] K. Salmawi, M. M. Abu Zeid, A. M. Naggar, M. Mamdouh, *J. Appl. Polym. Sci.* **72** (1999) 509.
- [88] A. N. Krklješ, M. T. Marinović-Cincović, Z. M. Kačarević-Popović, J. M. Nedeljković, *Thermochim. Acta* **460** (2007) 28.
- [89] M. Mostafavi, G. R. Dey, L. Francois, J. Belloni, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) 10184.
- [90] A. Henglein, D. Meisel, *Langmuir* **14** (1998) 7392.
- [91] S. H. Choi, S. H. Lee, Y. M. Hwang, K. P. Lee, H. D. Kang, *Radiat. Phys. Chem.* **67** (2003) 517.
- [92] M. Kumar, L. Varshney, S. Francis, *Radiat. Phys. Chem.* **73** (2005) 21.
- [93] F. K. Liu, Y. C. Hsu, M. H. Tsai, T. C. Chu, *Mater. Lett.* **61** (2007) 2402.
- [94] W. T. Wu, L. Shi, Y. Wang, W. Pang, Q. Zhu, *Nanotechnology* **19** (2008) 125607.
- [95] M. Endo, T. Hayashi, Y. A. Kim, H. Muramatsu, *Jpn. J. Appl. Phys.* **45** (2006) 4883.
- [96] M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Acc. Chem. Res.* **41** (2008) 60.
- [97] A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Expert Opin. Drug Del.* **5** (2008) 331.
- [98] C. Y. Hong, C. Y. Pan, *J. Mater. Chem.* **18** (2008) 1831.
- [99] S. Kumar Vashist, D. Zheng, G. Pastorin, K. Al-Rubeaan, J. H. T. Luong, F.-S. Sheu, *Carbon* **49** (2011) 4077.
- [100] L. Lacerda, S. Raffa, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Nanotoday* **2** (2007) 38.
- [101] R. P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 8438.
- [102] H. Ali-Boucetta, K. T. Al-Jamal, D. McCarthy, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Chem. Commun.* (2008) 459.

- [103] Z. Zhang, X. Yang, Y. Zhang, B. Zeng, S. Wang, T. Zhu, R. B. S. Roden, Y. Chen, R. Yang, *Clin. Cancer Res.* **12** (2006) 4933.
- [104] Z. Liu, M. Winters, M. Holodniy, H. Dai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 2023.
- [105] S. T. Yang, X. Wang, G. Jia, Y. Gu, T. Wang, H. Nie, C. Ge, H. Wang, Y. Liu, *Toxicol Lett.* **181**(3) (2008) 182.
- [106] Y. Xu, M. Mahmood, A. Fejleh, Z. Li, F. Watanabe, S. Trigwell, R. B. Little, V. P. Kunets, E. Dervishi, A. R. Biris, G. J. Salamo, A. S. Biris, *Int J Nanomedicine.* **5** (2010) 167.
- [107] C. Iancu, L. Mocan, *Int J Nanomedicine.* **6** (2011) 1675.
- [108] H. Jin, D. Heller, M. Strano, *Nano Letters* **8** (2008) 1577.
- [109] C. Richard, B.-T. Doan, J.-C. Beloeil, M. Bessodes, E. Toth, D. Scherman, *Nano Lett.* **8** (2008) 232.
- [110] M. Endo, S. Koyama, Y. Matsuda, T. Hayashi, Y. A. Kim, *Nano Lett.* **5** (2005) 101.
- [111] L. P. Zanello, B. Zhao, H. Hu, R. C. Haddon, *Nano Lett.* **6** (2006) 562.
- [112] M. Moniruzzaman, K. I. Winey, *Macromolecules* **39** (2006) 5194.
- [113] H. Dai, J. H. Hafner, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, R. E. Smalley, *Nature* **384** (1996) 147.
- [114] Y. Liu, X. Wang, K. Qi, J. H. Xin, *J. Mater. Chem.* **18** (2008) 3454.
- [115] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, J. T. Ramirez, *Nanotechnology* **16** (2005) 2346.
- [116] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Colloids Interface Sci.* **275** (2004) 177.
- [117] C. Baker, A. Pradhan, L. Pakstis, D. J. Pochan, S. I. Shah *J. Nanosci. Nanotechnol.* **5** (2005) 244.
- [118] S. Kang, M. Herzberg, D. F. Rodrigues, M. Elimelech, *Langmuir* **24** (2008) 6409.
- [119] M. Prodana, D. Ionita, C. Ungureanu, D. Bojin, I. Demetrescu, *Dig. J. Nanomater. Bios.* **6** (2011) 549.
- [120] S. Yu, Y. Ruizhi, K. Y. Pak *Carbon* **47** (2009) 1146.

- [121] D. J. Guo, H. L. Li *Carbon* **43** (2005) 1259.
- [122] H. P. Wu, X. J. Wu, M. Y. Ge, G. Q. Zhang, Y. W. Wang, J. Z. Jiang, *Compos. Sci. Technol.* **67** (2006) 1182.
- [123] P. C. Ma, B. Z. Tang, J. K. Kim, *Carbon* **46** (2008) 1497.
- [124] E. H. Espinosa, R. Ionescu, C. Bittencourt, A. Felten, R. Erni, G. Van Tendeloo, J. J. Pireaux, E. Llobet, *Thin Solid Films* **515** (2007) 8322.
- [125] F. Xin, L. Li, *Composites: Part A* **42** (2011) 961.
- [126] Y. Peng, Q. Chen, *Nanoscale Res. Lett.* **7** (2012) 195.
- [127] J. H. Jung, G. B. Hwang, J. E. Lee, G. N. Bae, *Langmuir* **27** (2011) 10256.
- [128] R. Mohan, A. Shanmugharaj, R. Sung Hun, *J. Biomed. Mater. Res. B* **96** (2011) 119.
- [129] V. K. Rangari, G. M. Mohammad, S. Jeelani, A. Hundley, K. Vig, S. R. Singh, S. Pillai, *Nanotechnology* **21** (2010) 095102.
- [130] G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhao, X. Guo, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 1378.
- [131] F. Tian, D. Cui, H. Schwarz, G. G. Estrada, H. Kobayashi, *Toxicol. In Vitro* **20** (2006) 1202.
- [132] V. E. Kagan, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, N. V. Konduru, A. I. Potapovich, A. N. Osipov, E. R. Kisin, D. Schwegler-Berry, R. Mercer, V. Castranova, A. A. Shvedova, *Toxicol. Lett.* **165** (2006) 88.
- [133] F. Q. Schafer, S. Y. Qian, G. R. Buettner, *Cell. Mol. Biol.* **46** (2000) 657.
- [134] Y. Sato, A. Yokoyama, K. I. Shibata, Y. Akimoto, S. I. Ogino, Y. Nodasaka, T. Kohgo, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, M. Ishiguro, R. Hatakeyama, F. Watari, K. Tohji, *Mol. Biosyst.* **1** (2005) 176.
- [135] C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. Macnee, K. Donaldson *Nat. Nanotechnol.* **3** (2008) 423.
- [136] J. G. Teeguarden, P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall, J. G. Pounds, *Toxicol. Sci.* **95** (2007) 300.

- [137] V. L. Colvin, *Nat. Biotechnol.* **21** (2003) 1166.
- [138] H.-F. Cui, V. K. Sandeep, K. Al-Rubeaan, J. H. T. Luong, F.-S. Sheu, *Chem. Res. Toxicol.* **23** (2010) 1131.
- [139] X. Chen, U. C. Tam, J. L. Czapinski, G. S. Lee, D. Rabuka, A. Zettl, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* (2006) **128** 6292.
- [140] C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman, V. L. Colvin, *Toxicol. Lett.* **161** (2006) 135.
- [141] M. Fenech, *Mutat. Res.* **455** (2000) 81.
- [142] K. Umegaki, M. Fenech, *Mutagenesis* **15** (2000) 261.
- [143] N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G. M. Wahl, *J. Cell Biol.* **140** (1998) 1307.
- [144] M. Fenech, M. Kirsch-Volders, A. T. Natarajan, J. Surralles, J. W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D. A. Eastmond, J. D. Tucker, P. Thomas, *Mutagenesis* **26** (2011) 125.
- [145] M. Fenech, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084-1104.
- [146] S. P. Jackson, *Carcinogenesis* **23** (2002) 687.
- [147] T. Tanaka, H. D. Halicka, X. Huang, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, *Cell Cycle* **5** (2006) 1940.
- [148] T. Tanaka, X. Huang, H. D. Halicka, H. Zhao, F. Traganos, A. P. Albino, W. Dai, Z. Darzynkiewicz, *Cytom. Part A* **71** (2007) 648.
- [149] E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, W. M. Bonner, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 5858.
- [150] T. Kouzarides, *Cell*, **128** (2007) 693.
- [151] A. Celeste, S. Difilippantonio, M. J. Difilippantonio, O. F. Capetillo, D. R. Pilch, O. A. Sedelnikova, M. Eckhaus, T. Ried, W. M. Bonner, A. Nussenzweig, *Cell* **114** (2003) 371.
- [152] X. Huang, H. D. Halicka, F. Traganos, T. Tanaka, A. Kurose, Z. Darzynkiewicz, *Cell Proliferat.* **38** (2005) 223.
- [153] M. Podhorecka, A. Skladanowski, P. Bozko, *Journal of Nucleic Acids* **2011** (2010) 920161.

- [154] D. O'Brien, A. Bleyer, D. G. Lidzey, D. D. C. Bradley, T. Tsutsui, *J. Appl. Phys.* **82** (1997) 2662.
- [155] R. Murphy, J. N. Coleman, M. Cadek, B. McCarthy, M. Bent, A. Drury, R. C. Barklie, W. J. Blau, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 3087.
- [156] V. Djordjevic, J. Djustebek, J. Cveticanin, S. Velickovic, M. Veljkovic, M. Bokorov, B. Babic Stojic, O. Neskovic, *J. Optoelectron. Adv. M.* **8** (2006) 1631.
- [157] J. Cveticanin, A. Krkljes, Z. Kacarevic-Popovic, M. Mitric, Z. Rakocevic, Dj. Trpkov, O. Neskovic, *Appl. Surf. Sci.* **256** (2010) 7048.
- [158] M. Fenech, *Mutat. Res.* **285** (1993) 35.
- [159] V. Weissig, T. Elbayoumi, M. Olsen (eds.), *Cellular and Subcellular Nanotechnology: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Springer Science, Business Media, New York **991** (2013) 315.
- [160] K. Morishita, T. Takarada, *J. Mater. Sci.* **34** (1999) 1169.
- [161] M. Stancu, G. Ruxanda, D. Ciuparu, A. Dinescu, *Optoelectronics and Advanced Materials* **5** (2011) 846
- [162] C. Von Sonntag, E. Bothe, P. Ulanski, D. J. Deeble, *Radiat. Phys. Chem.* **46** (1995) 527.
- [163] B. Wang, S. Mukataka, E. Kokufuta, M. Kodama, *Radiat. Phys. Chem.* **59** (2000) 91.
- [164] C. Von Sonntag, *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective*, Springer, Berlin, Heidelberg (2006) 200.
- [165] A. Krkljes, J. M. Nedeljkovic, Z. M. Kacarevic-Popovic, *Polym. Bull.* **58** (2007) 271.
- [166] J. Belloni, M. Mostafavi, in: C.D. Jonah, B.S.M. Rao (Eds.), *Radiation Chemistry: Present Status and Future Trends*, Elsevier, Amsterdam (2001).
- [167] A. Krklješ, Doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd (2009).
- [168] B. Karthikeyan, *Physica B* **364** (2005) 328.
- [169] P. K. Khanna, N. Singh, S. Charan, V.V.V.S. Subbarao, R. Gokhale, U. P. Mulik, *Mater. Chem. Phys.* **93** (2005) 117.
- [170] K. Dai, L. Shi, J. Fang, Y. Zhang, *Mater. Sci. Eng. A-Struct.* **465** (2007) 283.

- [171] T.I.T. Okpalugo, P. Papakonstantinou, H. Murphy, J. Mclaughlin, N.M.D. Brown, *Carbon* **43** (2005) 2951.
- [172] C. Pirlot, I. Willems, A. Fonseca, J. B. Nagy, J. Delhalle, *Adv. Engineering Materials* **4** (2002) c183
- [173] S. Hussain, A. K. Pal, *Mater. Lett.* **62** (2008) 1874.
- [174] W. T. Wu, Y. Wang, L. Shi, W. Pang, Q. Zhu, G. Xu, F. Lu, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 14702.
- [175] J. Cvetičanin, V. Koteski, J. Belošević-Čavor, A. Radosavljević, Z. Kačarević-Popović, Dj. Trpkov, D. Aćimović, Z. Rogić Miladinović, M. Cindrić, O. Nešković, *Vacuum* **89** (2013) 47.
- [176] M. Szymanska-Chargot, A. Gruszecka, A. Smolira, K. Bederski, *Acta Phys. Pol. A* **120** (2011) 1012.
- [177] S.-S. Choi, S.-H. Ha, H. M. Lee, J.-C. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **28** (2007) 1437.
- [178] J. M. Soler, E. Artacho, J. D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejon, D. S Portal, *J. Phys.: Condens. Matter* **14** (2002) 2745.
- [179] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **145** (1965) 561.
- [180] E. M. Fernandez, J. M. Soler, I. L. Garzon, L. C. Balbas, *Phys. Rev. B* **70** (2004) 165403.
- [181] H. Zhang, D. Tian, *Comp. Mater. Sci.* **42** (2008) 462.
- [182] I. Katakuse, T. Ichihara, Y. Fujita, T. Matsuo, T. Sakurai, H. Matsuda, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* **67** (1985) 229.
- [183] I. Katakuse, T. Ichihara, Y. Fujita, T. Matsuo, T. Sakurai, H. Matsuda, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* **74** (1986) 33.
- [184] M. N. Huda, A. K. Ray, *Phys. Rev. A* **67** (2003) 013201.
- [185] W. D. Knight, K. Clemenger, W. A. de Heer, W. A. Saunders, M. Y. Chou, M. L. Cohen, *Phys. Rev. Lett.* **52** (1984) 2141.
- [186] B. K. Jang, Y. Sakka, S. K. Woo, *J. Phys. Conf. Series* **156** (2009) 012005.
- [187] J. Cvetičanin, G. Joksić, A. Lesković, S. Petrović, A. Valenta Sobot, O. Nesković, *Nanotechnology* **21** (2010) 015102.

- [188] Z. Liu, S. Tabakman, K. Welsher, H. Dai, *Nano Res.* **2** (2009) 85.
- [189] M. Bottini, S. Bruckner, K. Nika, N. Bottini, S. Bellucci, A. Magrini, A. Bergamaschi, T. Mustelin, *Toxicol. Lett.* **160** (2006) 121.
- [190] A. Schrand, J. Johnson, L. Dai, S. M. Hussain, J. J. Schlager, L. Zhu, Y. Hong, E. Osawa, *Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanomaterials, Nanostructure Science and Technology* ed T J Webster, Springer, New York (2009)
- [191] F. H. Meng, W. E. Hennink, Z. Y. Zhong, *Biomaterials* **30** (2009) 2180.
- [192] N. W. S. Kam, Z. Liu, H. J. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 12492.
- [193] Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama, H. Dai, *ACS Nano* **1** (2007) 50.

BIOGRAFIJA

Ime: Jelena

Ime oca: Milorad

Prezime: Cvetićanin

Datum rođenja: 29.11.1978.

Mesto rođenja: Sombor, Srbija

OBRAZOVANJE:

Diplomirala na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 2003. godine odbranom diplomskog rada pod nazivom: *Elektrohemijska sinteza i osobine polipirola*, i stekla zvanje dipl. fizikohemičar.

Magistrirala na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 2007. godine odbranom magistarskog rada pod nazivom: *Sinteza i karakterizacija endohedralnih metalofulerena*, i stekla zvanje magistra fizičkohemijskih nauka.

ZAPOSLENJE:

Od 2004. godine zaposlena u Institutu za nuklearne nauke "Vinča", Laboratorija za fizičku hemiju.

PROJEKTI:

1. " Spektroskopska i izotopska istraživanja sistema (eko-, bio-, tehno-) ", br. 1995, (2002 – 2005)
2. " Hemija jona u gasnoj fazi: fulereni i atomski klasteri ", br. 142001, (2006-2010)
3. " Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nanomaterijali ", br. 45005 (2011–2014)

Prilog

Naučni radovi i saopštenja u kojima su publikovani rezultati iz doktorske disertacije

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M₂₁

1. J. Cvetičanin, G. Joksić, A. Leskovic, S. Petrović, A. Valenta Sobot, O. Nešković, *Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells*, Nanotechnology 21 (2010) 015102.
2. Jelena Cvetičanin, Aleksandra Krklješ, Zorica Kačarević-Popović, Miodrag Mitrić, Zlatko Rakočević, Djordje Trpkov and Olivera Nešković, *Functionalization of carbon nanotubes with silver clusters*, Applied Surface Science 256 (2010) 7048.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M₂₂

1. Jelena Cvetičanin, Vasil Koteski, Jelena Belošević-Čavor, Aleksandra Radosavljević, Zorica Kačarević-Popović, Djordje Trpkov, Danka Acimović, Zorana Rogić Miladinović, Mario Cindrić, Olivera Nešković, *MALDI TOF and theoretical investigation of silver clusters obtained by gamma irradiation*, Vacuum 89 (2013) 47.
2. V. Djordjevic, J. Djustebek, J. Cvetičanin, S. Veličković, M. Veljković, M. Bokorov, B. Babic Stojic, O. Nešković, *Methods of purification and Characterization of Carbon Nanotubes*, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials 8 (2006) 1631.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini M₃₃

1. J. Cvetičanin, A. Krklješ, Z. Kačarević-Popović, Đ. Trpkov, M. Cindrić, O. Nešković, *Mass Spectrometric Investigation of Silver Clusters*, Physical Chemistry 2010, September 21-24, 2010, Belgrade, Serbia, Proceedings 60-62.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu M₃₄

1. Jelena Cvetičanin, Zlatko Rakočević, Djordje Trpkov, Olivera Nesković, *Studies on carbon nanotubes/silver clusters composites*, TNT 2010 Trends in Nanotechnology, September 06-10, 2010, Braga, Portugal

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена Цветићанин

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

_____ Функционализовани материјали на бази угљеничних наноцеви _____

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2013.

Јелена Цветићанин

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Цветићанин

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Функционализовани материјали на бази угљеничних наноцеви

Ментор др Гордана Ћирић-Марјановић, ванредни професор, Факултет за
физичку хемију, Универзитет у Београду

др Оливера Нешковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке
Винча, Универзитет у Београду

Потписани _____ Јелена Цветићанин _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2013.

Јелена Цветићанин

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционализовани материјали на бази угљеничних наноцеви

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 16.10.2013.

Потпис докторанда

Jelena Veticic