



UNIVERZITET U NIŠU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



**Slobodan Lj. Glišić**

**RAZVOJ BIOKOMPLEKSA I NANOČESTICA  
BIOAKTIVNIH METALA STABILIZOVANIH  
OLIGOSAHARIDIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



**Slobodan Lj. Glišić**

**DEVELOPMENT OF BIOCOMPLEX AND  
BIOACTIVE METAL NANOPARTICLES  
STABILIZED BY OLIGOSACCHARIDES**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2018.

***Mentor:***

Prof. dr Milorad Cakić

Univerzitet u Nišu

Tehnološki fakultet u Leskovcu

***Članovi komisije:***

Prof. dr Goran S. Nikolić

Univerzitet u Nišu

Tehnološki fakultet u Leskovcu

Dr Žarko Mitić, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu

Medicinski fakultet u Nišu

***Datum odbrane:***

\_\_\_\_\_

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Milorad Cakić, redovni profesor Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu
Naslov:	Razvoj biokompleksa i nanočestica bioaktivnih metala stabilizovanih oligosaharidima
Rezime:	<p>U radu su razvijeni postupci sinteze kompleksa Cu i Co sa karboksimetil dekstranom (CMD) i dekstran sulfatom (DS), kao i nanočestice srebra (AgNPs) sa ekstraktom <i>Fumaria officinalis</i> (E) i derivatima dekstrana. Fizičko-hemijska, spektrofotometrijska i spektroskopska ispitivanja sintetisanih kompleksa dvovalentnih katjona biometala Cu i Co sa CMD i DS, pokazala su da se radi o jedinjenjima sledeće stehiometrije: <math>\text{Co(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math> i <math>\text{Co(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math>, odnosno, <math>\text{Cu(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math> i <math>\text{Cu(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math> sa <math>^4\text{C}_1</math> konformacijom <math>\alpha</math>-D-glukopiranoznog prstena i dva koordinirana molekula vode. CMD se ponaša kao bidentatni ligand sa asimetričnim helatnim vezivanjem koje može biti razlog formiranju tetragonalno deformisane oktaedarske koordinacije. Jedinjenja sa DS su pretežno jonska po svojoj prirodi. Razvijeni su netoksični, zeleni postupci sinteze AgNPs sa CMD, DS kao i ekstraktom <i>Fumaria officinalis</i>. Na formiranje AgNPs u svim ovim slučajevima je ukazala promena boje reakcione smeše kao i postojanje površinske plazmonske rezonance (SPR) trake u UV-Vis spektru. Veličina sfernih čestica je od 20-60 nm (SEM), a prisustvo AgNPs potvrđeno metodom XRD i EDX. Interakcije srebra sa ovim ligandima su slične kao i kod jedinjenja Co i Cu, osim kod AgNPs-E gde funkcionalne grupe sa kiseonikom ili azotom (NH, (NH)C=O, CNO, C-O-C i OH) imaju ulogu u redukciji <math>\text{Ag}^+</math> i stabilizaciji AgNPs-E. Predložen je model globalne strukture AgNPs sa CMD, DS i E, koji pretpostavlja postojanje tankog omotača organskih supstanci oko AgNPs, vezanih jakim jonskim ili koordinativnim vezama sa površinskim jonima srebra. AgNPs-E, AgNPs-DS i AgNPs-CMD pokazale su antimikrobnu aktivnost prema analiziranim test mikroorganizmima pa mogu imati primenu u medicini, veterini, farmaciji, kozmetici itd.</p>
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast:	Hemija i hemijske tehnologije
Ključne reči:	Biometali; polisaharidi; kompleksi; nanočestice, koordinaciona hemija, spektroskopija
UDK:	546.3-386:547.458
CERIF klasifikacija:	T 350 Hemijska tehnologija i inženjering
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. dr Milorad Cakić University of Niš, Faculty of Technology in Leskovac
Title:	Development of biocomplex and bioactive metal nanoparticles stabilized by oligosaccharides
Abstract:	<p>The methods of the Cu and Co complexes synthesis with carboxymethyl dextran (CMD) and dextran sulfate (DS), as well as the silver nanoparticles (AgNPs) with <i>Fumaria officinalis</i> extract (E), and dextran derivatives have been developed. Physicochemical, spectrophotometric and spectroscopic investigations of divalent covalent cations Cu and Co complexes with CMD and DS have shown that compounds of the following stoichiometry are synthesized: <math>\text{Co(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math> and <math>\text{Co(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math>, respectively, <math>\text{Cu(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math> and <math>\text{Cu(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2</math> with a <math>{}^4\text{C}_1</math> conformation of <math>\alpha</math>-glucopyranose ring and two coordinated water molecules. CMD behaves as a bidentate ligand with asymmetric chelating bonding, which may be the reason for the formation of tetragonally deformed octahedral coordination. Compounds with DS are predominantly ionic. Non-toxic, green synthesis processes of AgNPs with CMD, DS and <i>Fumaria officinalis</i> extract have been developed. The formation of AgNPs in all these cases has been indicated by a color change of the reaction mixture as well as the existence of surface plasmon resonance (SPR) band in the UV-Vis spectrum. The spherical particle size was 20-60 nm (SEM), and the presence of AgNPs is confirmed by the XRD and EDX method. Silver interactions with these ligands are similar to those of the Co and Cu, except for AgNPs-E where the functional groups with oxygen or nitrogen, such as (NH, (NH)C=O, CNO, C-O-C and OH), play a role in the reduction <math>\text{Ag}^+</math> and stabilization of AgNPs-E. A model of a general structure of AgNPs with CMD, DS and E is proposed, which presupposes the existence of a thin organic substances coat around AgNPs bounded by strong ionic or coordinative bonds with surface silver ions. AgNPs-E, AgNPs-DS and AgNPs-CMD have shown antimicrobial activity against analyzed microorganisms and can be used in medicine, veterinary medicine, pharmacy, cosmetics, etc.</p>
Scientific Field:	Technological engineering
Scientific Discipline:	Chemistry and chemical technology
Key Words:	Biometals; polysaccharides; complexes; nanoparticles; coordination chemistry, spectroscopy
UDC:	546.3-386:547.458
CERIF Classification:	T 350 Chemical technology and engineering
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na projektu TR 34012 pod nazivom „Biljni i sintetski bioaktivni proizvodi novije generacije”, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Najveću zahvalnost i poštovanje dugujem ljudima bez čije stručne pomoći i korisnih saveta ova doktorska disertacija ne bi imala kvalitet.*

*Deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji za rendgensku difrakciju »Dr Bela Ribar« na Departmanu za fiziku Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i laboratoriji za elektronsku mikroskopiju na Medicinskom fakultetu u Nišu. Zahvaljujem se dr Miroslavu Cvetinovu, naučnom saradniku, prof. dr Goranu M. Nikoliću, kao i svim zaposlenima u ovim laboratorijama na pruženoj pomoći.*

*Za ukazano poverenje, razumevanje, podršku i svestranu pomoć tokom izrade ovog istraživanja i mog naučno-istraživačkog i profesionalnog usavršavanja zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Miloradu Cakiću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na prenesenom iskustvu i znanju tokom naučnog rada. Posebno se zahvaljujem na dragocenoj pomoći pri izboru teme, realizaciji i interpretaciji dobijenih rezultata, kao i na korisnim sugestijama prilikom konačne izrade ove doktorske disertacije.*

*Dugujem veliku zahvalnost i prof. dr Goranu S. Nikoliću, koji je svojim nesebičnim zalaganjem dao veliki doprinos u izradi ove doktorske disertacije, a takođe dugujem zahvalnost i dr Žarku Mitiću, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu.*

*Na doktorsku disertaciju ne gledam kao na vrhunac, već kao na početak svoje karijere, jer sam spreman da otvaram nova poglavlja i samostalno ulazim u istraživanja.*

*Neizmernu zahvalnost za bezgraničnu podršku i razumevanje u toku studiranja dugujem svojoj porodici. Nadam se da ću na ovaj način delimično uspeti da im se odužim.*

*Slobodan Glišić*

## LISTA SIMBOLA, SKRAĆENICA I IZRAZA

A	apsorbancija
AAS	atomska apsorpciona spektroskopija (atomic absorption spectroscopy)
AgNPs	nanočestice srebra
ax	aksijalni
BM	borov magneton
c	količinska koncentracija ( $\text{mol dm}^{-3}$ )
$c$	brzina svetlosti ( $3 \cdot 10^{10} \text{ cm s}^{-1}$ )
CMC	karboksimetil celulozom
CMD	karboksimetil dekstran
d	dužina putanje zraka kroz uzorak (dm)
DS	natrijumova so dekstran sulfata
E	ekstrakt ( <i>Fumaria officinalis</i> )
$\varepsilon$	molarna apsorptivnost (molarni ekstinkcioni koeficijent)
EDX	energijska disperziona spektroskopija X-zraka (energy dispersive X-ray)
EMZ	elektromagnetno zračenje
eq	ekvatorijalni
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, (Fourier transform infrared)
GPC	gel permeaciona hromatografija
$h$	Planck-ova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ )
$I$	intenzitet zraka po prolasku kroz uzorak
$I_0$	intenzitet upadnog zraka
IR	infracrveno zračenje
KB	koordinacioni broj
LNT	temperatura ključanja tečnog azota (liquid nitrogen temperature)

MNPs	metalne nanočestice
$M_w$	srednja masena molarna masa
$O_h$	oktaedarska koordinacija
RT	sobna temperatura (room temperature)
SEC	size exclusion chromatography
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (scanning electron microscopy)
SPR	površinska plazmonska rezonanca (surface plasmon resonance)
$T$	transparentija
$T_d$	tetraedarska koordinacija
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija
tj.	to jest
UV	ultraljubičasta
Vis	vidljiva
XRD	difrakcija X-zračenja (X-ray diffraction)
$\gamma$	deformacione vibracije van ravni
$\delta$	deformacione vibracije u ravni
$\lambda$	talasna dužina (cm)
$\nu$	frekvencija ( $s^{-1}$ )
$\nu_{as}$	asimetrična vibracija
$\nu_s$	simetrična vibracija



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	8
2.1. Hemija kompleksnih (koordinacionih) jedinjenja.....	9
2.2. Biogeni metali M(II) (Biometali).....	13
2.3. Karakteristike elemenata prvog niza prelaznih metala Cu i Co .....	14
2.3.1. Biogeni metal - Bakar (Cu) .....	16
2.3.2. Biogeni metal - Kobalt (Co).....	17
2.4. Nanočestice srebra.....	18
2.5. Antimikrobna svojstva nanočestica srebra.....	23
2.6. Ugljeni hidrati kao ligandi.....	24
2.6.1. Egzopolisaharid dekstran.....	25
2.6.2. Derivati dekstrana.....	27
2.7. Lekovita dimnjača <i>Fumaria officinalis</i> L.....	30
2.8. Metode karakterizacije i strukturne korelacije kompleksa i nanočestica srebra .....	32
2.8.1. UV-Vis spektrofotometrija .....	32
2.8.1.1. Metoda kontinualnog variranja (Jobb-ova metoda).....	34
2.8.1.2. Metoda molskih odnosa .....	35
2.8.2. Interpretacija UV-Vis spektara ispitivanih metala .....	36
2.8.2.1. Elektronska struktura i spektri Co(II)-jona u kompleksnim jedinjenjima .....	36
2.8.2.2. Elektronska struktura i spektri Cu(II)-jona u kompleksnim jedinjenjima .....	38
2.8.3. Izračunavanje energije cepanja kristalnim poljem .....	39
2.8.4. Interpretacija UV-Vis spektara ispitivanih nanočestica srebra.....	39
2.8.4.1. UV-Vis karakteristike nanočestica srebra.....	39
2.8.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	42
2.8.5.1. Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije .....	48

2.8.6. Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) .....	49
2.8.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	50
2.8.8. Difrakcija X-zračenja (XRD) .....	51
2.8.9. Energijska disperziona spektroskopija X-zraka (EDX).....	52
2.8.10. Dijaliza.....	52
2.8.11. Gel permeaciona hromatografija (GPC-SEC) .....	53
2.8.12. Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra.....	53
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	55
3.1. Priprema uzoraka.....	56
3.1.1. Sinteza kompleksa bakra sa CMD.....	56
3.1.2. Sinteza kompleksa bakra sa DS.....	56
3.1.3. Sinteza kompleksa kobalta sa CMD.....	57
3.1.4. Sinteza kompleksa kobalta sa DS.....	57
3.1.5. Sinteza nanočestice srebra sa CMD.....	58
3.1.6. Sinteza nanočestice srebra sa DS.....	58
3.1.7. Sinteza nanočestice srebra sa ekstraktom <i>Fumaria officinalis</i> L .....	58
3.2. Metode ispitivanja .....	59
3.2.1. UV-Vis spektrofotometrija .....	59
3.2.1.1. Jobb-ova metoda bioelementa Cu.....	59
3.2.1.2. Metoda molskog odnosa bioelementa Cu .....	59
3.2.1.3. Jobb-ova metoda bioelementa Co .....	60
3.2.1.4. Metoda molskog odnosa bioelementa Co .....	60
3.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	60
3.2.3. Atomska apsorpciona spektrometrija (AAS).....	61
3.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	62
3.2.5. Difrakcija X-zračenja (XRD) .....	62
3.2.6. Energijska disperziona spektroskopija X-zraka (EDX).....	63

3.2.7. Dijaliza.....	63
3.2.8. Metoda ekstrakcije.....	63
3.2.9. Gel permeaciona hromatografija (GPC-SEC).....	64
3.2.10. Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra.....	64
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1. Fizičko-hemijske karakteristike kompleksa biometala Cu sa CMD i DS.....	67
4.1.1. Određivanje stehiometrije kompleksa.....	67
4.1.2. Spektar strukturne korelacije primenom metode UV-Vis spektrofotometrije.....	69
4.1.3. Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije.....	71
4.2. Fizičko-hemijske karakteristike kompleksa biometala Co sa CMD i DS.....	82
4.2.1. Određivanje stehiometrije kompleksa.....	82
4.2.2. Spektar strukturne korelacije primenom metode UV-Vis spektrofotometrije.....	84
4.2.3. Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije.....	85
4.3. Nanočestice AgNPs-CMD.....	90
4.3.1. UV-Vis spektrofotometrija.....	90
4.3.2. Gel permeaciona hromatografija (GPC-SEC).....	92
4.3.3. SEM mikroskopija.....	93
4.3.4. Difrakcija X-zraka (XRD).....	94
4.3.5. FTIR spektroskopija.....	95
4.3.6. Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-CMD.....	98
4.4. Nanočestice AgNPs-DS.....	100
4.4.1. UV-Vis spektrofotometrija.....	100
4.4.2. SEM mikroskopija.....	101
4.4.3. EDX analiza.....	102
4.4.4. Difrakcija X-zraka (XRD).....	103
4.4.5. FTIR spektroskopija.....	104
4.4.6. Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-DS.....	106

4.5. Nanočestice AgNPs-E .....	108
4.5.1. UV-Vis spektrofotometrija .....	108
4.5.2. SEM mikroskopija .....	111
4.5.3. EDX analiza.....	112
4.5.4. Difrakcija X-zraka (XRD) .....	115
4.5.5. FTIR spektroskopija .....	116
4.5.6. Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-E .....	118
4.6. Globalna struktura AgNPs .....	120
4.7. Uporedna analiza antimikrobne aktivnosti AgNPs .....	124
5. ZAKLJUČAK .....	126
6. LITERATURA .....	132
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA .....	154

## **1. UVOD**

Joni prelaznih metala (d-metali) mogu da grade sa suprotno naelektrisanim jonima i/ili neutralnim molekulima (ligandi) komplekse različitog tipa i strukture. Ligandi mogu biti neorganske, organske ili biološke prirode sintetičkog ili prirodnog porekla (bioligandi). Sa biološkog aspekta najznačajniji su kompleksi metala prve serije (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Ni i Zn) (Crichton, 2012) zbog sposobnosti da ostvaruju koordinaciju sa različitim donor atomima u brojnim enzimima, kao što su *dehidrogenaze*, *oksidaze*, *transferaze*, *izomeraze*. Aktivni centri enzima su najčešće joni Fe, Cu i Zn, a u manjoj meri Co. Metalni katjoni važni su za odvijanje bioloških procesa, kao što su nervna transmisija, transfer elektrona, reprodukcija, maturacija i sl. (Lewis, 1995; Foussard-Blanpin i Cayron, 1988). Deficit ili suficit jona metala, koji su potrebni živim ćelijama, rezultuju pojavom specifičnih oboljenja. Danas se u humanoj medicini i veterini, ali i kozmetologiji, aktivno primenjuju kao samostalni ili u kombinaciji sa drugim preparatima, jednostavni kompleksi na bazi jona Cu(II), Fe(III), Li(I), Al(III), Au(III), Ag(I), Pt(II) i dr. u terapiji različitih oboljenja, i to sa:

- cinkom (Zn) da bi se ublažile funkcionalne teškoće u pubertetu i menopauzi, u poboljšanju spermatogeneze,
- kobaltom (Co) za lečenje specifičnih anemija,
- bakrom (Cu) za maturaciju eritrocita i održavanje gvožđa u dvovalentnom stanju,
- gvoždem (Fe) u tretmanu sideropenične anemije,
- manganom (Mn) za prevenciju i lečenje povratnih infektivnih pojava i/ili alergije,
- srebrom (Ag) kod lečenja infektivnih bolesti, u dermatologiji za lečenje kožnih bolesti (psorijaza, ekcem, lišaj) i ozleda sluzokože,
- zlatom (Au) u lečenju reumatoidnog artritisa,
- platinom (Pt) u tretmanu kancerogenih oboljenja,
- litijumom (Li) u lečenju nervne depresije,
- bizmutom (Bi) kod lečenja čira na želucu,
- rutenijumom (Ru) antimetastatički agens u antikancerogenoj terapiji.

Pored mogućnosti formiranja kompleksa, mnogi joni metala (srebro, zlato, bakar, paladijum, platina, titan, gvožđe) u odgovarajućim reakcionim uslovima i prisustvo redukcionog sredstva koje ujedno ima i ulogu stabilizirajućeg agensa, mogu da formirajuju čestice malih razmera ( $< 1 \mu\text{m}$ ) koje se nazivaju metalne nanočestice (MNPs). Kod čestica ovakvih razmera prestaju da važe zakoni klasične fizike već dolaze do izražaja kvantnomehanički fenomeni.

Zbog toga se osobine nanočestica znatno razlikuju od onih makroskopskih dimenzija. Ove čestice imaju posebne fizičko-hemijske osobine (optičke, katalitičke i elektrostatičke), ali i biološku aktivnost (Trindade i Daniel-Da-Silva, 2011; Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013; Wei i sar., 2009; Tran i sar., 2010) i sve veću primenu u svakodnevnom životu u različitim oblastima. U oblasti medicine, farmacije i kozmetike posebno su značajne nanočestice srebra, zlata, paladijuma i platine. Zbog toga se poslednjih decenija intenzivno izučavaju procesi sinteze, karakterizacije i primene ovakvih čestica. U pogledu praktične primene, nanočestice srebra (AgNPs) posebno su interesantne zbog njihove potencijalne antimikrobne (Mohanta i sar., 2016a; Mohanta i sar., 2016b), antiproliferativne (Kim i sar., 2007; Nayak i sar., 2015), antioksidativne i antikancerogene aktivnosti (Mohanta i sar., 2017; Netala i sar., 2016; Venkatesan i sar., 2016; Devi i Bhimba, 2012). Zahvaljujući ovakvoj biološkoj aktivnosti AgNPs se intenzivno koriste u industriji hrane (pakovanje, konzervacija hrane i semena, biođubriva), za izradu kozmetičkih i farmaceutskih preparata, a i dobri su nosači lekovitih supstanci (Marambio-Jones i Hoek, 2010; Dipankar i Murugan, 2012). Pored ovih primena, ustanovljeno je da su AgNPs široko primenjene u oblasti visoko osetljive biomolekularne detekcije, dijagnostike, katalize i mikroelektronike (Mohanta i Behera, 2014). Kada je u pitanju primena srebra za izradu farmaceutskih i kozmetičkih preparata, treba imati u vidu činjenicu da srebro u nižim koncentracijama nije toksično za ljude, ali je toksično za niže organizme, bakterije i viruse (Chudobova i sar., 2013a; Ghaseminezhad i sar., 2012; Venediktov i Padokhin, 2008; Bin Ahmad i sar., 2011).

U literaturi su opisani različiti postupci sinteze AgNPs koji se baziraju na redukciji jona srebra različitim postupcima, kao što su hemijski, elektrohemijski, fotohemijski i dr. (Kanmani i Lim, 2013). Redukcija jona srebra se najčešće izvodi primenom različitih hemijskih postupaka. Kako bi se izbeglo korišćenje opasnih materija, poslednjih decenija se intenzivno razvijaju tzv. zeleni postupci sinteze „eng. *green synthesis*“. Ovi postupci uključuju primenu netoksičnih i biorazgradivih agenasa za redukciju jona srebra i stabilizaciju AgNPs, kao što su: proteini, polisaharidi i njihovi karboksimetilovani ili sulfonovani derivati, recimo dekstran, pululan, celuloza hitin i sl. (Quelemes i sar., 2013; Hamedi i sar., 2012; Chudobova i sar., 2013b; Krstić, 2013; Nadagouda i Varma, 2007; Liu i sar., 2009; He i sar., 2007; Shevchenko i sar., 1985; Tolmachev i sar., 1985; Garza-Navarro i sar., 2013; Prinz i sar., 2010). Kod hemijske sinteze koriste se supstance koje mogu da redukuju  $Ag^+$  jon do  $Ag^0$ , delujući ujedno i kao stabilizirajući agens tako što sprečavaju

agregaciju čestica koja je, spontan proces. Agregacija AgNPs tokom sinteze može da ometa proizvodnju nanočestica srebra sa malim i uniformnijim veličinama, pa se zbog toga dodaju stabilizatori koji sprečavaju agregaciju u vodenim rastvorima, jer formiranje agregata može smanjiti antimikrobnu sposobnost AgNPs. Agregativna stabilnost je rezultat adsorpcije molekula stabilizatora, čime se povećava elektrostatičko i sterno odbijanje između nanočestica (Tao i sar., 2011). Adsorpcija stabilizacionog molekula na površini nanočestica zavisi od reakcionih uslova sinteze, ali i od osobina stabilizirajućeg polimera, kao što su: molekulska masa, jonizacija i gustina punjenja stabilizujućeg molekula. Najčešće, za stabilizaciju se koriste različita površinski aktivna sredstva i polimeri tipa proteina, polisaharida i njihovih derivata.

U literaturi su opisani mnogi postupci zelene sinteze i karakterizacije AgNPs primenom netoksičnih i biorazgradivih agenasa. Ovi postupci uključuju primenu agenasa tipa polisaharida ili njihovih derivata, kao što su: dekstran, pululan, skrob ili derivat polisaharida karboksimetil celuloza (CMC), hitozan, hijaluronska kiselina, biokompozit AgNPs hitozan/želatina (Liu i sar., 2009; He i sar., 2007; Shevchenko i sar., 1985; Tolmachev i sar., 1985; Garza-Navarro i sar., 2013; Prinz i sar., 2010; Tao i sar., 2011; Abdel-Mohsen i sar., 2012).

U poslednje dve decenije razvoj zelenih postupaka sinteze AgNPs usmeren je na primenu ekstrakata dobijenih iz prirodnih proizvoda, pre svega biljnog porekla. Ovakvi ekstrakti imaju složen hemijski sastav, u kome su, pored ostalih, zastupljeni i biomolekuli (flavonoidi, proteini, polisaharidi, terpeni itd). Ova jedinjenja mogu da se koriste za sintezu AgNPs, s obzirom na to da mogu da redukuju jone srebra i deluju kao stabilizirajući agens (Huang i sar., 2007; Kumar i sar., 2010; Kouvaris i sar., 2012; Bar i sar., 2009; He i sar., 2013; MubarakAli i sar., 2011; Sathishkumar i sar., 2009; Amooaghaie i sar., 2015).

Fizičko-hemijska karakterizacija ovih čestica i kompleksa vrši se primenom različitih instrumentalnih metoda i tehnika. Najčešće su korišćene metode ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija (eng. *ultraviolet - visible*, UV-Vis) i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. *Fourier transform infrared*, FTIR), energijska disperziona spektroskopija X-zraka (eng. *energy - dispersive X-ray spectroscopy*, EDX), difrakcija X-zračenja (eng. *X-ray diffraction*, XRD), elektronska mikroskopija (skenirajuća elektronska mikroskopija, eng. *scanning electron microscopy*, SEM) i transmisiona elektronska



mikroskopija (eng. *transmission electron microscopy*, TEM). Ispitivana je i biološka aktivnost (antimikrobna, antikancerogena, antioksidativna) sintetisanih jedinjenja.

I pored brojnih istraživanja još uvek je otvoreno pitanje globalne strukture čestica, pre svega, priroda interakcija između AgNPs i redukujućeg i stabilizirajućeg agensa. Naime, interakcije između AgNPs i stabilizirajućeg agensa nisu u potpunosti razjašnjene. Prema jednom mišljenju one su rezultat koordinacije jona srebra sa O-donor atomima prisutnim u redukujućem agensu, kakva je recimo karboksilna grupa (Prinz i sar., 2010), a prema drugom u pitanju su interakcije fizičke - sterne prirode (Liu i sar., 2009; He i sar., 2007; Shevchenko i sar., 1985).

Polisaharidi i njihovi derivati ispunjavaju uslove ne samo da redukuju jone i stabiliziraju formirane MNPs, već i da sa jonima prelaznih metala formiraju komplekse. U literaturi su opisani mnogi postupci sinteze kompleksa nekih biometala, pre svega bakra, kobalta, gvožđa ili cinka sa polisaharidima i njihovim derivatima kao ligandima. Kod ovih jedinjenja veza M-O je kovalentno-koordinativne prirode (Iakovidis i sar., 2011; Expert group on vitamins and minerals, 2002; Weder i sar., 2002; Cakić i sar., 2007; Mitić i sar., 2011; Cakić i sar., 2008; Nikolić i sar., 2008; Nikolić i sar., 2009; Savić i sar., 2010; Mitić i sar., 2007; Cakić i sar., 2013; Jezierska i sar., 1997; Bartkowiak, 1998; Ajiboye i Brown, 1990). Karboksimetil dekstran (CMD) i dekstran sulfat (DS) ispunjavaju uslove da mogu da sa prelaznim metalima grade kompleksna jedinjenja, ali isto tako mogu i da redukuju jone  $\text{Ag}^+$  do  $\text{Ag}^0$  uz formiranje AgNPs, pri čemu imaju i ulogu zaštitnog agensa. U nama dostupnoj literaturi nema podataka o ovakvim jedinjenjima. Zbog toga su predmet ovog rada biokompleksi bakra i kobalta sa CMD i DS, kao i nanočestice srebra sa CMD i DS kao redukujućim i stabilizirajućim agensom. Pored toga, predmet ovog rada su AgNPs sa ekstraktom biljke *Fumaria officinalis* L, koji ispunjava uslove redukcionog i stabilizirajućeg agensa.

Ciljevi ovog rada su:

- razvoj postupka sinteze AgNPs sa karboksimetil dekstranom i dekstran sulfatom,
- razvoj zelenog postupka sinteze AgNPs sa ekstraktom *Fumaria officinalis* L,
- razvoj postupka sinteze kompleksa bakra i kobalta sa karboksimetil dekstranom i dekstran sulfatom,
- određivanje globalne strukture AgNPs kombinovanjem spektroskopskih i difrakcionih metoda,

- određivanje veličine AgNPs i praćenje stabilnosti sintetisanih nanočestica,
- određivanje molekulske strukture sintetisanih kompleksa bakra i kobalta sa karboksimetil dekstranom i dekstran sulfatom,
- antimikrobna aktivnost sintetisanih jedinjenja.

Da bi se na napred postavljene ciljeve moglo uspešno odgovoriti, korišćene su različite savremene metode i tehnike. Postupci sinteze biokompleksa i AgNPs izvođeni su pri različitim reakcionim uslovima (temperatura, vreme). Prečišćavanje sintetisanih AgNPs od jona i čestica manjih razmera, vršeno je metodom dijalize, što je posebno važno za spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije. Ishod sinteze, procena veličine i stabilnosti sintetisanih AgNPs vršeno je analizom traka od površinske plazmonske rezonance (eng. *surface plasmon resonance*, SPR), primenom metode ultraljubičaste-vidljive spektrofotometrije (eng. *ultraviolet - visible*, UV-Vis). UV oblast kod AgNPs-E posebno je analizirana sa ciljem utvrđivanja grupa biomolekula prisutnih u ekstraktu koje su odgovorne za redukciju i stabilizaciju AgNPs. Veličina i morfologija AgNPs ispitivana je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (eng. *scanning electron microscopy*, SEM). Energijska disperziona spektroskopija X-zraka (eng. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) korišćena je za ispitivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava sintetisanih čestica AgNPs-CMD, AgNPs-DS, AgNPs-E. Metoda difrakcije X-zračenja (eng. *X-ray diffraction*, XRD) primenjena je za određivanje tipa prostorne kristalne rešetke sintetisanih AgNPs. Sadržaj metala bakra, kobalta i srebra određivan je pomoću atomske apsorpcione spektrometrije (eng. *atomic absorption spectroscopy*, AAS). Molekulska struktura sintetisanih kompleksa izučavana je na osnovu spektar strukturnih korelacija. Primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom, (eng. *Fourier transform infrared*, FTIR), posebno u oblasti funkcionalnih grupa (-SO<sub>3</sub>H, -COOH), dobijene su informacije o: koordinacionoj sferi, interakcijama ili načinu vezivanja metal-ligand kod bioaktivnih kompleksa bakra i kobalta sa CMD i DS. Pored toga, ispitivane su i eventualne promene u strukturi liganda, kao što je promena konformacije glukopiranozne jedinice, položaj sulfo grupa, orijentacija-linearnost polimernog liganda, kao i prisustvo i način vezivanja molekula vode u strukturi kompleksa. S obzirom na to da iste funkcionalne grupe imaju ulogu u redukciji srebra, upoređivanjem spektara AgNPs sa onima iz kompleksa u ovoj oblasti, vršena je analiza i razjašnjenje prirode interakcije između AgNPs i redukujućeg i stabilizirajućeg agensa, odnosno CMD, DS i ekstrakta *Fumaria officinalis* L. U slučaju kompleksa bakra i kobalta, primenom metode UV-

Vis spektrofotometrije, dobijeni su odgovarajući podaci iz apsorpcionih spektara o vrsti elektronskih prelaza, geometrijskom rasporedu liganada oko centralnog metalnog jona i simetrijskim karakteristikama, energiji cepanja d-energetskih podnivoa i jačini veze M-L.

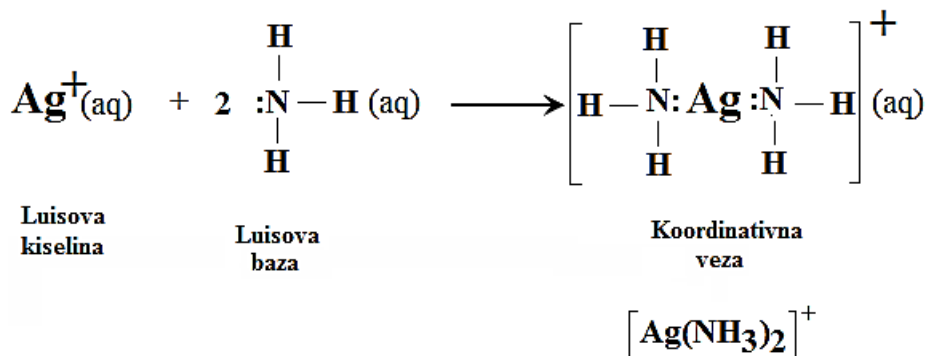
Antimikrobna aktivnost AgNPs sa derivatima polisaharida i ekstraktom *Fumaria officinalis* L, analizirana je primenom disk-difuzione metode.

## **2. TEORIJSKI DEO**

## 2.1. Hemija kompleksnih (koordinacionih) jedinjenja

Koordinaciona hemija predstavlja jednu od osnovnih grana neorganske hemije. Rezultati istraživanja ove naučne discipline imaju veliki fundamentalni (u razumevanju hemijskih veza, pre svega i višestrukih metal-metal veza, stereochemije mnogih jedinjenja, definisanju nekih osnovnih hemijskih koncepata) (Kauffman, 1987), ali i praktični značaj. Naime, naučni i praktični interes koordinacione hemije su kompleksna jedinjenja ili koordinaciona jedinjenja koja predstavljaju složena jedinjenja metala sa neorganskim, organskim ili ligandima biološkog porekla.

Metali koji grade komplekse ponašaju se kao Luisove kiseline: primaju elektronski par nekog molekula ili jona, pri čemu se formira koordinativna veza (donorsko-akceptorska), pa se upravo zbog toga ovakva jedinjenja nazivaju i koordinaciona jedinjenja. Na Slici 1 je šematski prikazano formiranje ovakve veze sa jonima srebra i amonijakom u vodenoj sredini.



**Slika 1.** Šematski prikaz formiranja koordinativne veze sa jonima srebra i amonijakom u vodenoj sredini

*Centralni atom* (graditelj kompleksa) može biti atom ili jon bilo kog elementa. Centralni atom je akceptor elektronskih parova. Prema elektronskoj konfiguraciji centralni atomi se mogu podeliti u tri grupe:

1. *Prvu grupu* čine centralni atomi koji u obliku pozitivnih jona imaju elektronsku konfiguraciju plemenitih gasova  $1s^2$  ili  $ns^2np^6$  ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Fr}^+$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{V}^{5+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Mn}^{7+}$  i dr),

2. *Drugu grupu* čine centralni atomi koji u obliku pozitivnih jona imaju elektronsku konfiguraciju  $(n-1)d^{10}ns^2$  ( $Ga^{1+}, Ge^{2+}, In^{1+}, Sn^{2+}, Sb^{3+}, Te^{4+}, Tl^{1+}, Pb^{2+}, Bi^{3+}, Po^{4+}, Ga^{3+}, In^{3+}, Ti^{3+}, Pb^{4+}, Sn^{4+}, Bi^{5+}$  i dr),
3. *Treću grupu* čine centralni atomi koji u obliku neutralnih atoma, pozitivnih ili negativnih jona (oksidacionog stanja) imaju elektronsku konfiguraciju pseudo-plemenitih gasova  $(n-1)d^{10}$  ( $Mn^{3+}, Fe^{2+}, Co^{1+}, Ni^0, Cu^{1+}, Zn^{2+}, Ru^{2+}, Rh^{1+}, Pd^0, Ag^{1+}, Cd^{2+}, Os^{2+}, Ir^{1+}, Pt^0, Au^{1+}, Hg^{2+}$  i dr).

*Ligandi* su atomi, joni ili neutralni molekuli, direktno vezani za jon metala. Oni sadrže slobodne elektronske parove preko kojih se vezuju za centralni jon. Zbog velike raznovrsnosti, ligandi se mogu podeliti u različite grupe: prema vrsti naelektrisanja, broju donorskih atoma, vrsti donorskih atoma i vrsti veze koju grade sa metalima ( $\sigma$  i  $\pi$  ligandi).

### Podela liganada prema naelektrisanju

Prema naelektrisanju ligandi se dele u tri grupe:

- *anjonske* - ovoj grupi liganada pripadaju joni halogenih elemenata ( $F^-, Cl^-, Br^-, J^-$ ), hidroksidni ( $OH^-$ ) i cijanidni ( $CN^-$ ) jon, anjoni okso ( $NO_2^-, NO_3^-, SO_4^-$ ) i karboksilnih kiselina (acetatni, oksalatni i tartaratni jon),
- *neutralne* - molekuli sa atomom koji je donor elektronskog para. Najpoznatiji su molekuli  $H_2O, NH_3, CN_3NH_2$  i  $CO$ , zatim etilendiamin, ( $NH_2CH_2CH_2NH_2$ ), različiti alkil amini ( $R_3N$ ), arsini ( $R_3As$ ) i fosfini ( $R_3P$ ),
- *katjonske* - najpoznatiji su nitrozilijum ( $NO^+$ ), hidrazinijum ( $N_2H_5^+$ ) i tetrametilamonijum ( $(CH_3)_4N^+$ ).

### Podela liganada prema broju donorskih atoma

Prema broju donorskih atoma ligandi se dele na:

- *monodentatne* - imaju samo jedan donorski atom i zauzimaju jedno koordinaciono mesto, kao što su joni ( $F^-, Cl^-, Br^-, J^-, OH^-, CN^-, NO_2^-, NO_3^-, CH_3COO^-$ ) ili molekuli ( $H_2O$  i  $NH_3$ ),
- *bidentatne* - imaju dva donorska atoma i mogu zauzeti dva koordinaciona mesta: karbonatni, oksalatni i glicinatni jon, molekul etilendiamina, propilendiamina i bpiridina,

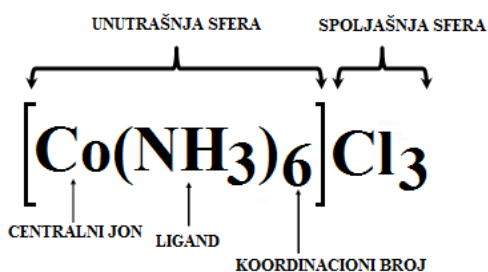
- *tridentatne* - imaju tri donorska atoma i zauzimaju tri koordinaciona mesta; primer tridentatnog liganda je molekul dietilentriamina,
- *tetradentatne* - imaju četiri donorska atoma,
- *pentadentatne* - imaju pet donorskih atoma.

### Podela liganada prema vrsti donorskih atoma

U zavisnosti od toga koji atom je donor elektronskog para za građenje veze sa centralnim jonom metala ligandi se klasifikuju kao:

- N-donor (amini, piridin, aminokiseline, biperidil),
- O-donor (alkoholi, etri, aldehidi, ketoni, estri i karboksilne kiseline),
- S-donor (karbamati, ditiokarbamati, polisulfidi).

Kompleksna jedinjenja se sastoje od dva dela: unutrašnjeg i spoljašnjeg. U unutrašnjem delu (koordinacioni centar) nalaze se joni metala (graditelj kompleksa, centralni atom) i molekuli ili joni liganada koji su vezani za centralni atom koordinativnom vezom. Ukoliko je ovaj deo naelektrisan, naziva se kompleksni jon, pa se zbog elektroneutralnosti čitavog sistema u drugom delu (spoljašnja sfera) nalaze katjoni ili anjoni u zavisnosti od naelektrisanja čestica (v. Sl. 2).



**Slika 2.** Struktura kompleksnog jedinjenja

Skup liganada oko centralnog jona čini koordinacionu sferu. Broj liganada koji su direktno vezani za centralni metal zove se koordinacioni broj (KB) koji zavisi od prirode centralnog atoma, njegove elektronske konfiguracije i veličine, ali i od koordinacione sposobnosti liganda. Koordinacioni broj može biti 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8, ali je najčešći 4 i 6. Pri ostvarivanju odgovarajuće koordinacije dolazi do izmene kako osobina centralnog atoma, tako i osobina liganda. Ako su svi ligandi istog tipa, kompleks se naziva homoleptički, u suprotnom su

heteroleptički. Kompleksi mogu biti katjonski  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_3$ ,  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{SO}_4$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ , anjonski  $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ ,  $(\text{H}_2\text{O})_2[\text{Hg}(\text{SCN})_4]$ ,  $\text{Na}_2[\text{Co}(\text{OH})_4]$  ili neutralni  $[\text{CoF}_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ ,  $[\text{CoCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ , u zavisnosti od sume naelektrisanja centralnog jona metala i liganda (Li i sar., 2008; Dragojević i sar., 2007a). Atom liganda koji je direktno vezan za centralni jon metala zove se donorski atom. Ligandi koji imaju samo jedan donorski atom i koji su za graditelja kompleksa vezani pomoću samo jednog elektronskog para zovu se monodentatni ligandi, a oni sa više od jednog donorskog atoma- polidentatni ligandi ili helatni ligandi (Dragojević i sar., 2007a). Pošto se karboksilatna i sulfatna-grupa mogu slično vezivati na više načina, broj mogućnosti za njihovo koordiniranje je veoma veliko (v. Tab. 1).

**Tabela 1.** Načini koordinacije  $\text{COO}^-$ -grupa (Cotton i Wilkinson, 1988a)

Tip koordinacije		Simetrija	Načini koordinacije
Nekoordinirana karboksilatna grupa (jonski tip)			
Monodentatna koordinacija		jedan akceptor	
		dva akceptora asimetrično mostovno ponašanje	
Bidentatna koordinacija	Helatno ponašanje	simetrično	
		asimetrično	
	Mostovno ponašanje	prikazano je simetrično ponašanje	
Polidentatna koordinacija		mostovno ponašanje	
		kombinovano ponašanje	



Kompleksna jedinjenja su ne samo od naučnog, već i praktičnog interesa. Reakcije nastajanja kompleksnih jedinjenja su u osnovi brojnih reakcija, na kojima se zasnivaju analitički postupci za razdvajanje, maskiranje, dokazivanje i određivanje jona metala u rastvoru ili u drugim raznovrsnim sistemima i sredinama. Praktična važnost kompleksnih jedinjenja je velika, jer su mnoga našla primenu u industriji kao katalizatori, boje i pigmenti (Gibson i Marshall, 2003; Pettinari i sar., 2003; Gregory, 2003), u medicini kao lekovi, a mnogi od njih se koriste u lečenju najtežih bolesti, kao dijagnostički reagensi ili kao biohemijski markeri i reagensi, hemoterapeutici i kontrastna sredstva (Farrell, 2003; Tóth i sar., 2003), u nanotehnologiji kao prekursori poluprovodnih filmova i nanočestica (O'Brien i Pickett, 2003).

Pored korisnog dejstva, kompleksna jedinjenja mogu imati i toksično delovanje na ljudski organizam. To ograničava njihovu primenu, ali istovremeno otvara puteve za pronalaženje novih jedinjenja koja će biti efikasniji detoksikanti. Na bazi prelaznih metala napravljeni su brojni katalizatori koji se primenjuju u realizaciji važnih industrijskih procesa, kao što je na primer proizvodnja  $\text{HNO}_3$  (Nikolić i sar., 2010). Životno važni procesi, kao što je na primer disanje, odvijaju se uz učešće enzima u kojima su biometali (gvožđe, bakar, kobalt, cink) vezani preko biomolekula u obliku kompleksnih čestica. Nedostatak ili višak biometala u živim organizmima rezultuje pojavom karakterističnih oboljenja, pa se u humanoj medicini i veterini koriste za lečenje, pored ostalih, i preparati na bazi njihovih kompleksa. Mnogi od kompleksa imaju dokazanu antimikrobnu i antifungalnu aktivnost. Polje njihove primene je sire i uključuje, pored ostalih, farmaceutsku, kozmetičku, industriju hrane, tekstilnu industriju.

Poslednjih decenija, zbog velike praktične primene i specifičnih osobina, široko se ispituju nanočestice metala, pre svega zlata, srebra, platine i paladijuma koje poseduju i antikancerogenu aktivnost.

## **2.2. Biogeni metali M(II) (Biometali)**

Jednovalentni (Na i K) i dvovalentni biometali (Ca, Mg, Zn, Co, Cu, Mn, Mo i Fe) prisutni su u različitim biosistemima, u različitim količinama i promenljivim oksidacionim stanjima. Joni biometala mogu se unositi hranom, suplementima ili farmaceutskim preparatima i mogu da

stupaju u interakciju sa malim molekulima ili delovima makromolekula koji su prisutni kao konstituenti živih ćelija, s obzirom na prisustvo elektron donor atoma u različitim funkcionalnim grupama ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_3$ ). Ove interakcije su bitne za iskorišćenost biometala u organizmu, distribuciju, zadržavanje metala u organizmu, za potencijalnu eliminaciju metala iz organizma, kao i molekula koji stupaju u interakciju sa njima (detoksikaciju). Rezultat ovakvih interakcija može biti i nastajanje novih jedinjenja koja mogu biti sastavni delovi telesnih tečnosti ili tkiva, što može promeniti osobine metala, pre svega rastvorljivost. Zbog toga su biometali važni za odvijanje različitih bioloških procesa živih organizama, a njihov deficit ili suficit može dovesti do poremećaja odvijanja ovakvih procesa, što se manifestuje pojavom karakterističnih oboljenja. Preporučeni dnevni unos pojedinih M(II) biometala može se naći u literaturi (Rose, 2007). Tako prema navedenoj preporuci, dnevni unos bakra i kobalta koji su predmet ove disertacije, treba da iznosi 1-2 mg i 0.006  $\mu\text{g}$ , respektivno. Ukoliko se joni biometala mogu zameniti jonima drugih, sličnih fizičko-hemijskih osobina kao što su oni teških metala, može doći do njihovog vezivanja sa delovima biomolekula ili aktivnim centrima enzima ispoljavajući toksični efekat.

### 2.3. Karakteristike elemenata prvog niza prelaznih metala Cu i Co

Raznovrsna uloga biometala bakra (Cu) u živim organizmima vezana je, s jedne strane, za njegovu polivalentnost, a s druge za sklonost njegovih jona da grade kompleksna jedinjenja. Javlja se u tri stabilna oksidaciona stanja: Cu(I), Cu(II) i Cu(III) pri čemu geometrija centralnog atoma zavisi od oksidacionog stanja (v. Tab. 2). Prema broju valentnih elektrona i fizičko-hemijskim osobinama, ovaj jon gradi pretežno kompleksne čestice i fragmente sa koordinacionim brojem 6, deformisane  $O_h$  strukture zbog nejednakih dužina veze u aksijalnom i ekvatorijalnom položaju. Takođe, gradi i komplekse sa koordinacionim brojem 4 tetraedarske i kvadratno-planarne strukture (Filipović i Lipanović, 1982). Cu(0) jedinjenja nisu potvrđena kao stabilna, međutim mogu se naći kao reaktivni intermedijeri.

Jon Cu(II) gradi brojne rastvorne soli i veliki broj kompleksnih jedinjenja sa ligandima različite dentatnosti i različitim donor atomima. Skoro svi Cu(II) kompleksi su plavi ili zeleni, a magnetni momenti jednostavnih kompleksa su nezavisni od temperature (osim na ekstremno niskim temperaturama,  $T < 5 \text{ K}$ ) i nalaze se u intervalu od 1,75 do 2,20 BM (Borov magneton) (Cotton i Wilkinson, 1988e).

**Tabela 2.** Stereochemija dvovalentnog bakra

Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
$\text{Cu}^{\text{II}}, d^9$	3	Trigonalna planarna
	4	(Pseudo) tetraedarska
	4	Kvadratno planarna
	5	<i>tbp, kp</i>
	6	(Pseudo) oktaedarska
	7	Pentagonalna bipiramidalna ( <i>pbp</i> )
	8	(Pseudo) dodekaedarska

Zbog relativno niskog stepena simetrije kod jedinjenja gde je Cu(II) centralni jon, često dolazi do komplikacija pri detaljnoj interpretaciji apsorpcionih spektara i magnetnih svojstava kompleksa.

Kobalt (Co) se javlja u nekoliko oksidacionih stanja, pri čemu su najstabilniji kompleksi gde je centralni atom Co(II) ili Co(III). Jon Co(II) sa  $d^7$  elektronskom konfiguracijom može da gradi komplekse različite geometrije kako je to prikazano u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Stereochemija dvovalentnog kobalta

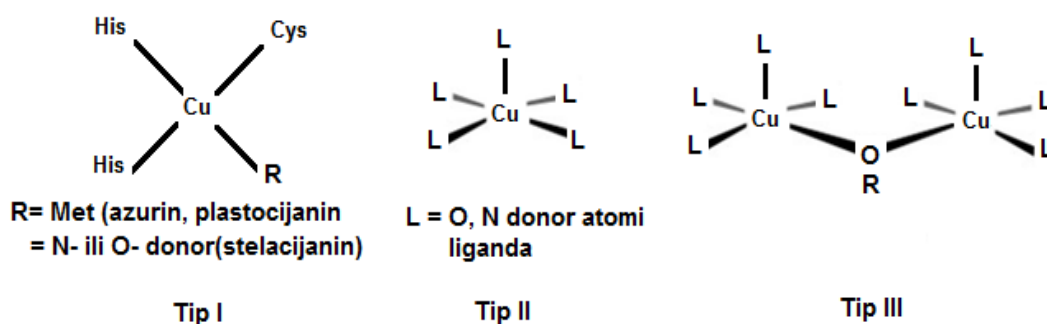
Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
$\text{Co}^{\text{II}}, d^7$	3	Trigonalna
	4	Tetraedarska
	4	Kvadratno planarna
	5	<i>tbp, kvadratno piramidalna (kp)</i>
	6	Oktaedarska
	8	Dodekaedarska

Fizičko-hemijske osobine Co(II) kompleksa, posebno boja, spektralne i magnetne karakteristike mogu biti veoma različite. Kod visokospinskih oktaedarskih Co(II) kompleksa može se uočiti tipična svetlocrvena ili ljubičasta boja i vrednost efektivnog magnetnog momenta na sobnoj temperaturi u intervalu između 4,7 i 5,2 BM (Borov magneton).

Niskospinski oktaedarski kompleksi Co(II) su retki i imaju tendenciju da otpuštaju ligande i na taj način formiraju jedinjenja sa nižim KB koordinacionim brojem (4 ili 5) (Cotton i Wilkinson, 1988c).

### 2.3.1. Biogeni metal - Bakar (Cu)

*Biološki značaj bakra.* Prvi put je pokazano da je bakar esencijalni element za biološke sisteme još davne 1920. godine, kada je pronađeno da se anemija kod eksperimentalnih životinja javlja kao rezultat smanjenog unosa bakra u toku redovne ishrane istih. Dodatkom soli bakra, kasnije, dolazi do korekcije nastalog patološkog stanja (Weder i sar., 2002). U biološkim procesima živih organizama bakar ima važnu ulogu u procesu vezivanja kiseonika, redoks procesima, elektron-transfer procesima i ulazi u sastav većeg broja enzima. Raznovrsna uloga ovog biometala u živim organizmima vezana je, s jedne strane, za njegovu polivalentnost, a s druge za sklonost njegovih jona da grade kompleksna jedinjenja. Bakar je aktivni centar brojnih metaloenzima i to: enzima za transport elektrona (*azurin*, *plastocijanin*), enzima koji učestvuju u procesima oksigenacije (*tirozinaza*, *askorbat oksidaza*, *fenolaza*), enzima za transport kiseonika (*hemocijanin*). U enzimskim sistemima bakar može biti prisutan u deformisanoj  $T_d$  koordinaciji vezan preko N- i S-donor atoma biomolekula (Tip I), u trigonalno bipiramidalnoj koordinaciji (Tip II) i kao binuklearni centar Cu(II)-jona sa koordinacionim brojem 5 i kiseonikom kao most ligandom (Tip III), (Lawrance, 2013), (v. Sl. 3).



**Slika 3.** Tipovi aktivnih Cu-centara u enzimima sa odgovarajućom geometrijskom strukturom  $[CuL_n]$  fragmenata

Preko brojnih enzimskih sistema bakar učestvuje u raznovrsnim procesima u organizmu (formiranje hemoglobina, metabolizam ugljenih hidrata, biosinteza kateholamina, antioksidativna zaštita organizma). Dnevne potrebe organizma za bakrom, na osnovu preporuka Svetske zdravstvene organizacije, kreću se u intervalu od 0,9 do 1,3 mg/dan, iste se zadovoljavaju korišćenjem u ishrani hrane bogate ovim metalom (plodovi mora, jetra, pasulj, orasi, žitarice, krompir, grašak i razno povrće) (WHO, 2004).

*Toksičnost bakra.* Iako je bakar esencijalni biometal za živi svet, ipak u koncentracijama većim od  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> može da dovede do poremećaja normalnih funkcija u organizmu, može da inhibira enzime bitne za normalno funkcionisanje organizma (kisela fosfataza). Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, 2004) maksimalno dozvoljena dnevna količina bakra, koja može da se unese u organizam, jeste 10-12 mg. Ukoliko se unese višak bakra može da dovede do hemolitičke anemije i poremećaja rada bubrega. Na osnovu literaturnih podataka sadržaj bakra od 8 ppm u pijaćoj vodi može da dovede do mučnine, povraćanja, bolova u stomaku i dijareje. Količina od 1-2 g može da dovede do ozbiljnih simptoma trovanja ovim metalom, hemolize, destruktivnih oštećenja moždanog i tkiva jetre. Takođe, povećan sadržaj ovog metala u organizmu čoveka može da dovede i do poremećaja u kardiovaskularnom sistemu (Kaličanin i Nikolić, 2011).

### 2.3.2. Biogeni metal - Kobalt (Co)

*Biološki značaj kobalta.* Kobalt kao mikroelement ima ulogu u metabolizmu proteina i amino kiselina za transfer metil grupa od metil donora do metil akceptora kao sastavni deo metaloenzima (*metiltransferaza* i *metioninsintetaza*) (Crichton, 2012). *Heksokinaza* je enzim koji katalizuje reakciju fosforilacije glukoze i u njemu se kobalt nalazi u obliku kompleksa  $\text{Co(III)}\beta,\gamma\text{-Co(NH}_3)_4\text{ATP}$ . Kobalt je sastavni deo antianemičnog vitamina B12 (cijanokobaltamina) kojeg ne sintetišu ni biljke ni životinje, već samo pojedini mikroorganizmi. Vitamin B12 indirektno reguliše sintezu DNK. U njemu je kobalt sa koordinacionim brojem 6, i to koordinisan preko pet N-donor atoma, dok jedno koordinaciono mesto zauzima  $\text{-CN}$  ligand. Kao koenzim neophodan je za više enzimskih reakcija, kao i za normalnu funkciju hematopoetskog sistema, nervnog sistema i mnogih drugih tkiva, kao i za pravilan rast i razvoj organizma (Tsiliou i sar., 2012). Ovaj metal učestvuje u hematopoezi, i to preko vitamina B12, koji ima važnu ulogu u procesu maturacije eritrocita. Kobalt stimuliše

i produkciju eritropoetina, koji povećava iskorišćavanje gvožđa u ćelijama koštane srži (Cakić i sar., 2007).

*Toksičnost kobalta.* Svoje toksično dejstvo kobalt ispoljava kada se u organizam unosi u dozama većim od dozvoljenih ili kada se organizam izlaže dugotrajnom uticaju ovog metala, pa makar on bio i u manjim koncentracijama. Svoje toksično dejstvo kobalt ispoljava na tiroidnu žlezdu (inhibicija tirozin-jodinaze, gušavost, miksedem), na pluća (kobaltova astma), na kožu (kontaktni alergijski dermatitis), kao i na imuni sistem. Mehanizam toksičnog delovanja ovog metala još uvek nije dovoljno jasan, mada se isti povezuje sa: velikim afinitetom metala da se vezuje za sulfhidrilne grupe važnih enzima u mitohondrijalnoj respiraciji; mogućnošću da zameni dvovalentne metale kao aktivne centre enzima; antagonizmom sa Ca(II)-jonom; sposobnošću da proizvodi reaktivne kiseonične vrste i na taj način izaziva oksidativni stres organizma (oštećenje DNK, proteina i lipida). Co(II)-jon izaziva takođe i apoptozu ćelija, a u većim koncentracijama i nekrozu sa inflamatornim odgovorom. Takođe, ovaj metal ima i genotoksičan uticaj, dovodi do kardiomiopatije, stimuliše produkciju eritropoetina i povećava eritropoezu (Simonsen i sar., 2012).

## 2.4. Nanočestice srebra

Nanotehnologija je, relativno mlada, multidisciplinarna oblast u kojoj se primenjuju znanja prirodnih nauka i inženjerski principi sa ciljem da se dobiju, okarakterišu i primene materijali veličine nanometra (Ramsten, 2014). Materijali nanodimenzija imaju specifične karakteristike. Kada se broj atoma koji čine materijal znatno smanji, atomi zauzimaju drugačiji raspored i menja se međurastojanje za površinske atome, što dovodi do promene fizičkih i hemijskih karakteristika u odnosu na materijale istog sastava, ali makroskopskih dimenzija (Trajković i Marković, 2010). Poslednjih nekoliko decenija, metalne nanočestice (zlata, srebra, platine, paladijuma i mnogih oksida metala, i kompozitnih materijala na njihovoj bazi) su fokus mnogih istraživačkih grupa (Krstić, 2013; Nadagouda i Varma, 2007; Liu i sar., 2009; He i sar., 2007; Shevchenko i sar., 1985; Tolmachev i sar., 1985).

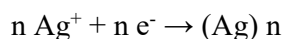
Veličina metalnih nanočestica kreće se u opsegu od 1 do 100 nm. Nanočestice, zahvaljujući velikoj specifičnoj površini u odnosu na zapreminu, kao i velikoj površinskoj energiji, imaju jedinstvene katalitičke, električne, magnetne, optičke i mehaničke karakteristike (Horikoshi, 2013).

Nanočestice srebra su zbog svojih katalitičkih (Jiang i sar., 2005; Saha i sar., 2010) i optičkih (McFarland i Duyne, 2003) osobina, kao i antimikrobne aktivnosti (Bhattacharya i Mukherjee, 2008), privukle pažnju mnogih istraživačkih grupa. One se mogu sintetizovati različitim postupcima - metodama:

1. hemijskom redukcijom jona srebra (u prisustvu redukcionog i stabilizirajućeg sredstva) i to u vodenim rastvorima (Leopold i Lendl, 2003; Caswell i sar., 2003; Chaki i sar., 2004), kao i u nevodenim rastvorima (Chen i Huang, 2002; Wang i sar., 2003; Faure i sar., 2003),
2. elektrohemijskom metodom (Johans i sar., 2004),
3. redukcijom jona srebra pomoću ultrazvuka (Zhang i sar., 2004),
4. redukcijom indukovanom ili katalizovanom fotohemijskim putem (Shchukin i sar., 2003; Zhang i sar., 2003; Cozzoli i sar., 2004),
5. sintezom indukovanom mikrotalasima (Komarneni i sar., 2002; Yamamoto i sar., 2004),
6. radijaciono-hemijskom redukcijom (Hornebecq i sar., 2003; Lihui i sar., 2004),
7. mikroemulzionom metodom (Zheng i sar., 2003; Zheng i sar., 2004; Maillard i sar., 2002; Maillard i sar., 2003) i
8. biohemijskom redukcijom jona srebra (Naik i sar., 2002; Bhainsa i D'Souza, 2006).

Takođe, nanočestice srebra se mogu sintetisati u hidrogelovima, bubrenjem hidrogelova u rastvorima  $\text{Ag}^+$  jona i naknadnom redukcijom jona srebra. U zavisnosti od uslova sinteze nanočestice mogu biti različite veličine i oblika (Yu i Yam, 2005; Sharma i sar., 2009; Mochochoko i sar., 2013).

Kod svih postupaka sinteze AgNPs osnovna reakcija je redukcija jona srebra do elementarnog srebra:



Pri tome treba imati u vidu veliku tendenciju ka aglomeraciji, što umanjuje odnos površine i zapremine, a time se menjaju i svojstva nanočestica. Zbog toga se kod izbora redukcionog agensa mora voditi računa i o njegovim svojstvima kao zaštitnog agensa koji sprečava aglomeraciju. U tom cilju mogu se koristiti različite supstance, najčešće polimeri sintetskog

ili prirodnog porekla, posebno biopolimeri polisaharidnog tipa i njihovi derivati (Quelemes i sar., 2013; Hamedi i sar., 2012; Chudobova i sar., 2013b; Krstić, 2013; Nadagouda i Varma, 2007; Liu i sar., 2009; He i sar., 2007; Shevchenko i sar., 1985; Tolmachev i sar., 1985; Garza-Navarro i sar., 2013; Prinz i sar., 2010). Sve veća primena nanočestica srebra u mnogim oblastima, posebno favorizuje tzv. netoksične, odnosno “zelene” postupke sinteze. Za razliku od fizičkih i hemijskih sintetičkih metoda, zelena sinteza ima niz prednosti: manja potrošnja energije, jednostavno izvođenje, troškovi se smanjuju, korišćenje netoksičnih hemikalija kao redukujući i stabilizujući agens, koji omogućava biokompatibilno i *in vivo* primenjivanje formiranih čestica (Amooaghaie i sar., 2015; Sathishkumar i sar., 2009; Bar i sar., 2009; MubarakAli i sar., 2011). Postoji stalno veliki interes za zelene sintetičke procedure gde se biljni ili drugi prirodni proizvodi koriste kao redukujući i zaštitni agens. Jedan od načina prelaska na netoksične sinteze je korišćenje prirodnih proizvoda, tj. vodenih ekstrakata biomase, kao i polimera prirodnog ili sintetičkog porekla, čiji su producenti različiti mikroorganizmi, kao redukcionog i stabilizirajućeg agensa. Kao što je poznato, biljke mogu da proizvode različite fitohemikalije kao što su flavoni, ketoni, terpenoidi, aldehidi, amidi, karboksilne kiseline, glikozidi, polisaharidi, proteini i sl. Ovakve fitohemikalije sadrže u svojoj strukturi funkcionalne grupe koje mogu da redukuju  $Ag^+$  do  $Ag^0$  i da imaju ujedno ulogu zaštitnog agensa. Metode zelene sinteze za formiranje nanočestica sa različitim biljnim ekstraktima opisane su u literaturi (Vilchis-Nestor i sar., 2008; Shankar i sar., 2004; Abu Bakar i sar., 2007; Vigneshwaran i sar., 2006; Chandran i sar., 2006; Shankar i sar., 2004; Shankar i sar., 2005; Sharma i sar., 2007; de Aragão i sar., 2016; Ebrahiminezhad i sar., 2016; Huang i sar., 2007; Sabri i sar., 2016). Za biomedicinsku primenu se kao atraktivan zeleni agens pokazao med, koji istovremeno redukuje srebro i stabilizuje nanočestice srebra. Med se koristi u medicinske svrhe od davnina zbog svog sastava i specifičnih karakteristika. Med se sastoji od različitih ugljenih hidrata (>80 %), pri čemu su najzastupljeniji fruktoza i glukoza čineći udeo od oko 70 %, dok je saharoza (stoni šećer) zastupljena ~ 5 %. Ostatak je voda oko 20 %, dok su proteini zastupljeni u malom procentu oko 0,3 %. Prilikom sinteze nanočestica srebra u medu glukoza služi za redukciju srebra, a proteini meda za stabilizaciju nanočestica. Da bi redukcija srebra počela, neophodno je prisustvo natrijum hidroksida koji olakšava otvaranje glukoznog prstena, što omogućava jonima srebra da oksiduju glukozu do glukonske kiseline. Tokom ove hemijske reakcije nastaju nanočestice srebra i glukonska kiselina, a sve ostale komponente meda ostaju nepromenjene. Takođe pokazano je da što je viša pH vrednost (odnosno pri većim koncentracijama natrijum hidroksida) to se stvara veći

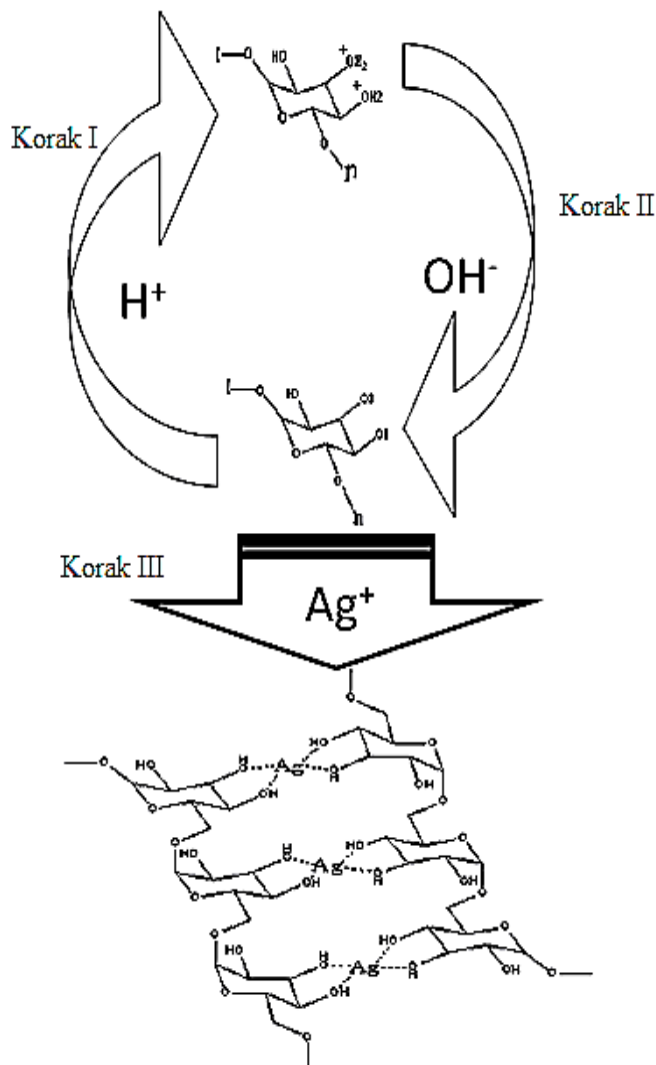


broj veoma malih nanočestica  $\sim 4$  nm (Philip, 2010; Jull i sar., 2008; Raveendran i sar., 2006). Od biopolimera najčešće su korišćeni polisaharidi i njihovi derivati: celuloza i karboksimetil celuloza, dekstran (Berry i sar., 2003), CMD i DS, pululan, alginat, agar, skrob (Chairam i Somsook, 2008; Chairam i sar., 2009), hitozan (Park i sar., 2005) i glikogen, ali i ekstrakti iz prirodnih proizvoda (Vilchis-Nestor i sar., 2008; Shankar i sar., 2004; Abu Bakar i sar., 2007; Vigneshwaran i sar., 2006; Chandran i sar., 2006; Shankar i sar., 2004; Shankar i sar., 2005; Sharma i sar., 2007; de Aragão i sar., 2016; Ebrahiminezhad i sar., 2016; Huang i sar., 2007; Sabri i sar., 2016). Od sintetičkih polimera, zbog biokompatibilnosti, koriste se PVP, PVA, poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) i poli(metil metakrilat) (PMMA) (Stasica i sar., 2000; Darwis i sar., 2002).

Mehanizam redukcije jona srebra i stabilizacija formiranih AgNPs polisaharidima, dobro je objašnjen u radu (Bankura i sar., 2012), koji je prikazan na Slici 4 na primeru sinteze nanočestice srebra u vodi, uz korišćenje dekstrana kao redukujućeg i zaštitnog sredstva.

Nanočestice srebra ne mogu da se sintetišu korišćenjem rastvora dekstrana u prečišćenoj vodi, jer prečišćena voda ima slabu kiselost ( $\text{pH} = 6$ ) koja može da spreči redukciju  $\text{Ag}^+$  na  $\text{Ag}^0$  u nanometarskom rasponu formiranjem  $\text{R-O}^+\text{H}_2$  (korak-I). Prisustvo veoma niske koncentracije NaOH može osloboditi hidroksilne grupe dekstrana uklanjanjem protona (korak-II) i pomaže formiranje nanočestice srebra što se uočava promenom boje rastvora (korak-III) (Bankura i sar., 2012).

Agregativna stabilizacija nanočestica srebra pomoću rastvora polimera (uključujući polisaharide i njihove derivate) objašnjava se elektronskim interakcijama funkcionalnih grupa polimera i nanočestica metala. Naime, nukleofilni karakter funkcionalnih grupa polimera je dovoljno izražen da bi se nanočestice metala vezale donorskim elektronima (Henglein, 1993). Takođe, polimeri mogu da stvore koordinativne veze sa jonima metala, formirajući kompleks polimer/metalni jon koji se lako može redukovati. Takav redukovani kompleks sadrži čestice metala manjih dimenzija i uže raspodele veličina (Esumi i sar., 1998).



**Slika 4.** Šematski prikaz mehanizma protonacije (Korak-I), deprotonovanjem (Korak-II) hidrosilne grupe dekstrana i koordinacije veze između molekula dekstrana i srebra nanočestica (Korak-III) (Bankura i sar., 2012)

Nakon redukcije, efekat stabilizacije se može objasniti na dva načina: vezivanjem nanočestica za polimer ili inkapsulacijom nanočestica metala unutar strukture polimera (sterne interakcije) (Kuo i Chen, 2003).

## 2.5. Antimikrobna svojstva nanočestica srebra

Antimikrobne osobine srebra su već vekovima poznate. Tako je posuđe od srebra korišćeno za čuvanje vode, dok su jedinjenja koja sadrže srebro korišćena u tradicionalnoj medicini (Armentano i sar., 2010; Slawson i sar., 1992). U poslednjih nekoliko decenija zabeležen je značajan porast mikroorganizama koji su rezistentni na postojeće antibiotike, što je vratilo srebro u medicinsku primenu (Monteiro i sar., 2009). Danas postoje različiti proizvodi koji u sebi sadrže srebro kao što su antimikrobne obloge za rane, masti i premazi koji se najčešće koriste u tretmanu inficiranih opekotina, otvorenih rana i hroničnih ulkusa (Travan i sar., 2009; Dubas i sar., 2011). Pokazano je da nanočestice imaju veću antimikrobnu aktivnost od jona srebra (Lok i sar., 2006). Nanočestice deluju na nivou ćelijske (citoplazmatske) membrane tako što interaguju sa strukturnim proteinima menjajući permeabilnost membrane, a zatim i sa membranskim enzimima inhibirajući njihovu aktivnost (Li i sar., 2010). Nanočestice takođe penetriraju u ćeliju interagujući sa DNK, što utiče na sposobnost replikacije ćelije. Pri tome se nanočestice i rastvaraju oslobađajući jone srebra koji takođe deluju antimikrobno (Morones i sar., 2005). Pokazano je da nanočestice srebra deluju na različite viruse (Xiang i sar., 2011), bakterije (Guzman i sar., 2012; Radzig i sar., 2013) i gljive (Panáček i sar., 2009). Hemijski sintetisane nanočestice srebra u rastvorima različitih saharida pokazale su antibakterijsku aktivnost prema 10 različitih vrsta bakterija, pri čemu su najmanje nanočestice u ovoj studiji prečnika 25 nm bile najefikasnije, dok su najveće nanočestice prečnika 50 nm imale najslabiju antimikrobnu aktivnost (Panáček i sar., 2006). Takođe je pokazano da oblik nanočestica značajno utiče na antimikrobnu aktivnost (Pal, 2007). Pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti nanočestica srebra različitih oblika (štapice, sferične i trouglaste nanočestice) prema *E. coli* ATCC 10536, pokazano je da su najefikasnije nanočestice trouglastog oblika, dok su nanočestice štapičastog oblika imale najslabiju antimikrobnu efikasnost. Nanočestice srebra se već komercijalno koriste za obloge za rane (Acticoat, Smith&Nephew, SAD), ali imaju potencijalnu primenu za antimikrobne kreme i gelove (Jain i sar., 2009), kao i za prevlake za katetere, drenove i implante (Knetsch i Koole, 2011). Nanočestice srebra su takođe, zbog svoje snažne antimikrobne aktivnosti, veoma atraktivne komponente za poboljšanje funkcionalnosti membrana za tretman otpadnih voda, kao i filtera za vodu (Jain i Pradeep, 2005; Kim i der Bruggen, 2010). Međutim, glavni problem primene nanočestica srebra je njihovo brzo otpuštanje sa površine polimera od kojeg su membrane napravljene (Tseng i sar., 2006), pa je koncentracija srebra u filtriranoj vodi

iznad dozvoljene koncentracije od 0,1 mg/l po EPA standardu (Environmental Protection Agency-EPA). Stoga se funkcionalnost membrana poboljšava imobilizacijom nanočestice srebra unutar vlakana polimera od kojih je membrana napravljena. Na taj način se mali procenat nanočestica otpusti iz polimera u filtriranu vodu, a antimikrobna aktivnost ostaje nepromenjena (Van Phu i sar., 2013).

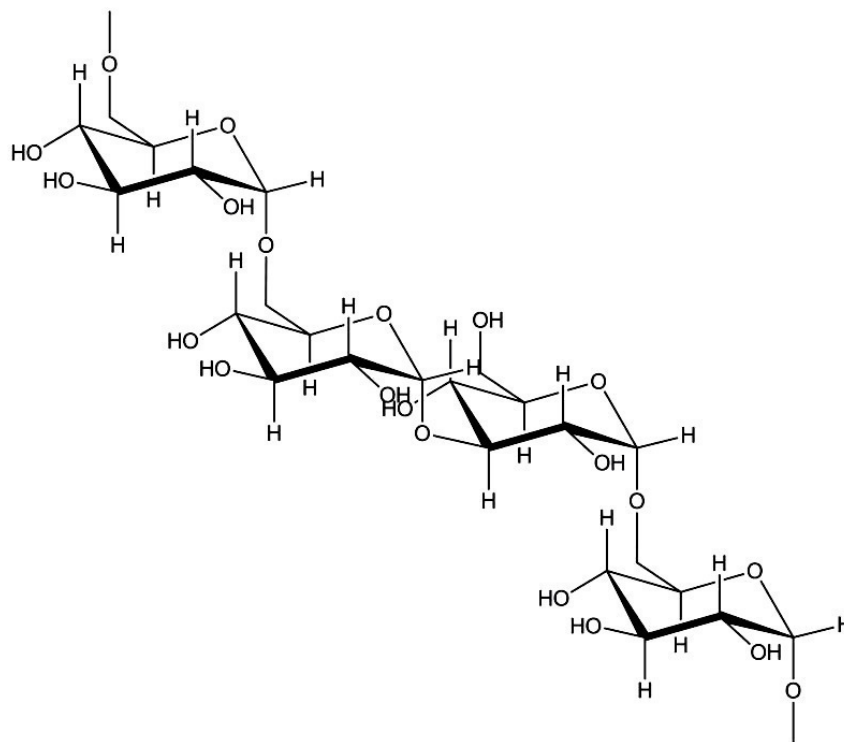
## 2.6. Ugljeni hidrati kao ligandi

Ugljeni hidrati predstavljaju veoma rasprostranjenu grupu prirodnih proizvoda koje sintetišu živi organizmi i koji zauzimaju značajno mesto u životnim ciklusima. Oni čine oko 80 % mase suve supstance biljaka i oko 2 % kod životinja, kao energetske rezerve (npr. kao skrob) ili su gradivne materije (celuloza). Osnovna empirijska formula ugljenih hidrata je  $C_nH_{2n}O_n$  ili  $(C_n(H_2O)_n)$  iz koje se vidi da je broj atoma ugljenika isti kao i broj atoma kiseonika, što navodi na zaključak da je za svaki ugljenikov atom vezan po jedan atom kiseonika. Polisaharidi imaju različite i u mnogim slučajevima kompleksne hemijske strukture, brojne fiziološke funkcije i širok spektar potencijalne primene. Osnovu ugljenohidratne strukture polisaharida predstavljaju monosaharidne jedinice koje međusobno mogu biti povezane preko različitih položaja i orijentacija, što strukturnu hemiju polisaharida čini veoma složenom. Mogu biti kovalentno vezani sa proteinima ili lipidima i u obliku složenih glikokonjugata čine biološki važna jedinjenja koja imaju različite funkcije. Na osnovu toga da li su sastavljeni od istih ili različitih monosaharidnih jedinica, razlikuju se homo- i heteropolisaharidi, respektivno. U zavisnosti od strukturnog uređenja monomernih jedinica, dele se na linearne i račvaste. Prema funkcionalnim grupama u njihovim molekulima, mogu se svrstati u anjonske, neutralne ili katjonske polisaharide. Prema izvorima iz kojih se dobijaju, dele se na polisaharide biljaka, životinja i mikroorganizama. Polisaharidi se u industriji koriste kao zgušnjivači, stabilizatori i gelirajući agensi. Takođe, koriste se i kao agensi za uklanjanje zagađivača iz životne sredine, a zbog bioloških dejstava, kao što su antioksidativni, probiotički ili antitumorski, interes za hemiju polisaharida svakodnevno raste (Đaković, 1985; Wikipedija, Donot i sar., 2012; Liu i sar., 2010a). Mogu se izolovati iz različitih izvora (bakterija, gljiva, algi i biljaka), mada su polisaharidi algi i viših biljaka dominantni na svetskom tržištu. Ovi biopolimeri se izoluju direktnom ekstrakcijom iz biomase i mogu se koristiti u nativnom obliku, dok u hemijskom vidu imaju primenu u različitim oblastima. Tako, recimo, dekstran koji predstavlja polisaharid dobijen

mikrobiološkom sintezom je molekularni lanac anhidro-D-glukopiranoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,6 glikozidnim vezama (pored ovih  $\alpha$ -1,6 mogu postojati i druge,  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,4). Ima primenu kao najefikasniji zamenik krvne plazme, koristi se u postoperativnoj terapiji za sprečavanje venskih tromboza, kao i za izradu granuliranih gela u gel-hromatografiji (Nikolić, 2001).

### 2.6.1. Egzopolisaharid dekstran

Dekstran je razgranati egzopolisaharid koji se sastoji od D-glukopiranoznih ostataka međusobno povezanih  $\alpha$ -1,6 glikozidnim vezama u osnovnom nizu, sa različitim sadržajem  $\alpha$ -1,2),  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,4 grana, i različitom konformacijom glukopiranozne jedinice (Sarwat i sar., 2008)(v. Sl. 5). Dekstran je prirodni proizvod, ali se može sintetisati iz saharoze posredstvom pojedinih bakterija mlečne kiseline, među kojima su najpoznatije *Leuconostoc mesenteroides* i *Streptococcus mutans*. On ima medicinsku primenu kao antitrombotik, za redukovanje viskoznosti krvi, i kao sredstvo za povećanje zapremine kod anemije. Upotrebljava se kao zamena za krvnu plazmu u tretiranju šoka prouzrokovanog gubitkom telesne tečnosti (Belder, 1985; Rehm, 2010). Polisaharid dekstran ima izvanrednu sposobnost formiranja u vodi rastvornih kompleksa sa različitim biometalima (Fe, Cu, Co, Zn, Ca, Mg), kao i drugim metalima (Tb, Al, Cd, Pb, Ni, Mn) (Cakić i sar., 2008; Nikolić i sar., 2009; Mitić i sar., 2009; Nikolić i sar., 2008; Mitić i sar., 2007; Mitić, 2008; Vasko i sar., 1971; Barker i sar., 1953). Sirovi dekstran se ne može upotrebiti u kliničke svrhe, jer poseduje toksična i antigena svojstva. Iz navedenih razloga se sirovi dekstran depolimerizuje i više puta frakcioniše hidrofилnim rastvaračima u cilju dobijanja frakcija sa što užom raspodelom molarnih masa. Molekuli dekstrana sa velikom molarnom masom zbog svoje toksičnosti izazivaju sporedne reakcije u organizmu, dok se molekuli sa malim molarnim masama vrlo brzo izlučuju iz organizma. U kliničke svrhe se upotrebljavaju samo dekstrani sa malim stepenom razgranatosti, tj. oni sa sadržajem  $\alpha$ -1,6 veza preko 90 %. Dekstrani su čvrste amorfne supstance bele boje. Delimično hidrolizovani dekstran rastvara se u vodi, formamidu, dimetilformamidu, dimetilsulfoksidu, etilenglikolu, glicerolu i u rastvoru alkalija. Različiti alkoholi i acetoni ne rastvaraju dekstran, već ga naprotiv talože iz rastvora.



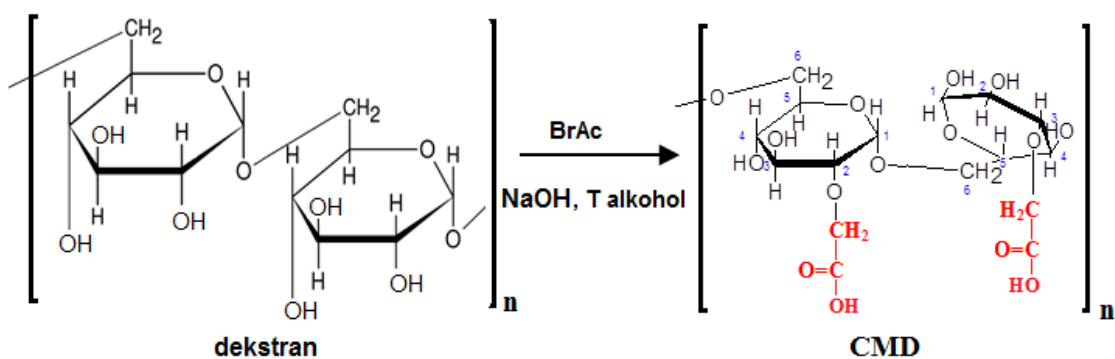
**Slika 5.** Molekulska forma dekstrana

*Reaktivnost dekstrana* (ali i drugih polisaharida, recimo pululana, inulina, skroba, celuloze, agara, agaroida, hondroitin sulfata itd) prvenstveno zavisi od reaktivnosti sekundarnih, ekvatorijalno orijentisanih hidroksilnih grupa glukopiranozne jedinice (OH na C-2, C-3 i C-4). Mali je procenat primarnih OH grupa u dekstranu (oko 1,5 %), mada se neznatno uvećava pri nižim molarnim masama zbog doprinosa iz neredukcionih terminalnih CH<sub>2</sub>OH grupa. Reaktivnost sekundarne OH grupe, na atomu C-2, ka alkilirajućim reagensima je viša nego kod C-3 i C-4. Povećanje kiselosti OH grupe na C-2 može se objasniti blizinom anomernog centra. Kada se OH grupe na C-2 i C-4 jonizuju, smanjuje se reaktivnost OH grupe na C-3. Međutim, zamena OH grupa na C-2 i C-4 poništava ovo dejstvo uz uzastopno povećanje reaktivnosti OH grupe na C-3. Treba napomenuti da je potrebna izvesna predostrožnost pri primeni ovih generalizacija, pošto jačina baze može da utiče na relativne i apsolutne reaktivnosti hidroksila. Zbog toga dekstran može da gradi različita jedinjenja među kojima su, zbog svoje biološke funkcije i farmakološke aktivnosti, važni estri sa neorganskim ili organskim kiselinama, ali i kompleksna jedinjenja sa biometalima (Ricketts, 1952b; Kentaro i Kotaro, 1974). Iz grupe estara i etara najpoznatiji su dekstran i celuloza, tj. i karboksimetil dekstran i karboksimetil celuloza, kao i dekstran sulfat. Ova jedinjenja se primenjuju u

farmaciji i kozmetici za izradu mnogih preparata kod kojih imaju funkciju punioca ili pak zbog svoje hidrofilnosti za izradu hidratnih krema. S obzirom na prisustvo karboksilne i sulfo funkcionalne grupe mogu da grade komplekse sa biometalima ili druge derivate, najviše sa Šifovim bazama (aminokiseline) koje se dalje mogu kompleksirati, recimo sa platinom, i koristiti u terapiji kancera, kao redukcion i stabilizirajući agensi za sintezu MNPs ili kao njihovi nosači (Tao i sar., 2011). Svakako najpoznatije jedinjenje dekstrana (ali i drugih polisaharida, pululana i inulina) jeste njegov polinuklearni kompleks sa gvožđem (pravilnije sa  $\beta_2$ -FeOOH formom gvožđe hidroksida), imajući u vidu njegovu široku primenu u humanoj medicini i veterini u terapiji sideropenične anemije (Cakić i sar., 2007).

## 2.6.2. Derivati dekstrana

*Karboksimetil dekstran (CMD)* je derivat dekstrana, koji se dobija eterifikacijom dekstrana sa halogen acetatnom kiselinom, (najčešće hlor- ili brom-hlor) u mešavini alkohola i vodenim rastvorom natrijum hidroksida, kako je to šematski prikazano na Slici 6. Sinteza karboksimetil dekstrana izvodi se u dva stupnja, prvi predstavlja alkalizaciju dekstrana, a drugi karboksimetilovanja dekstrana sa hlor-sirćetnom kiselinom. CMD se rastvara u destilovanoj vodi, a može se istaložiti etanolom. Karboksimetil grupa menja karakteristike dekstrana u vodi, a naročito viskozitet vode. S obzirom na postojanje više hidroksilnih grupa u strukturi, eterifikacija može teorijski da ide do stepena eterifikacije 3, ali s obzirom na reaktivnost one na C-3, koja se najlakše eterifikuje, najčešće se dobija sa stepenom eterifikacije 1.



Slika 6. Šematski prikaz sinteze CMD

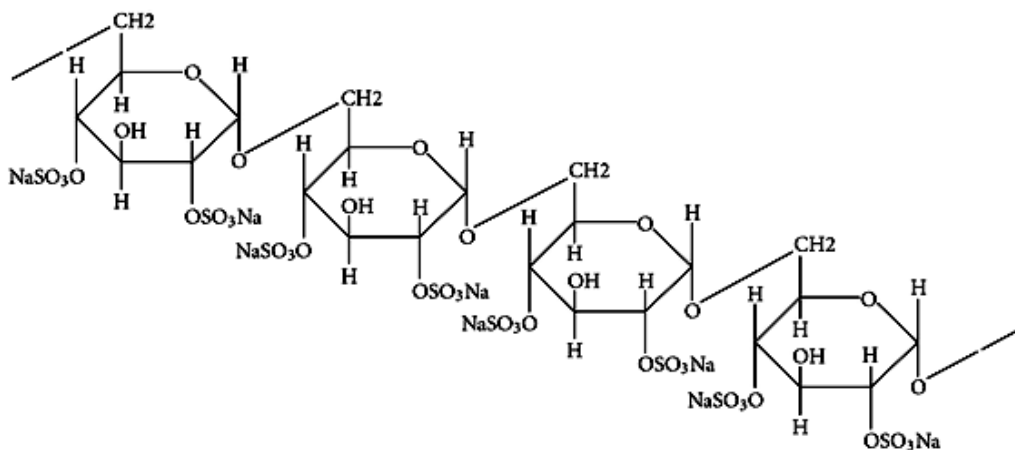
Karboksimetil dekstran ima širok spektar aplikacija, kao što je imobilizacija biomolekula, inženjering tkiva, u izgradnji polimernih membrana koje se koriste u razvoju biomaterijala (biostrukture za primenu kao što je isporuka lekova).

*Dekstran sulfat (DS)* predstavlja ester sumporne kiseline i dekstrana. S obzirom na to da po jednoj glukopiranoznoj jedinici dekstrana postoje tri OH grupe, stepen esterifikacije, bar teorijski posmatrano, bi mogao da se kreće do maksimalno tri. Osnovna razlika između ovakvih estara je srednja molarna masa, kao i stepen esterifikacije. Pored dekstran sulfata poznati su i inulin sulfati, pululan sulfati, ali i drugi (agar i agaroid, hondroitin sulfat i dr.) (Ricketts, 1952a). Interes za ispitivanje ovakvih sulfata polisaharida je veliki pošto se pokazalo da poseduju antiviralno dejstvo (pululan sulfat, antikoagulativno, protiv čira i sl.) pa su zbog toga potencijalna jedinjenja za izradu farmaceutskih preparata u terapiji peptičkog čira, side (AIDS) i sl. (Schraum-Thirl, 1971). Mnogi od sulfata kao dekstran sulfat su i komercijalni proizvodi. Tako recimo, firma SIGMA isporučuje dekstran sulfat u obliku natrijumove soli:  $M_w = 500\ 000$  i  $M_w = 7\ 000$  g/mol, što ga čini rastvornim i stabilnim u vodi. Dekstran sulfati sadrže 17 % sumpora, koji je ekvivalentan sa 2,3 sulfatne grupe po glukoznom ostatku. U rastvorima slabe jonske jačine dekstran sulfatni polimer će biti jako istegnut i izdužen, zbog odbijanja negativno naelektrisanih sulfatnih grupa. U rastvorima velike jonske jačine polimer se skuplja i više nalikuje nejonizovanom dekstranu (Silverberg i Diehl, 1987). Promene pH preko titabilnog opsega sulfatne grupe izaziva izduženje i kontrakciju.

*Delovanje.* Uključenje dekstran sulfata u koncentraciji od 10 % je pokazalo ubrzavanje hibridizacije obeleženih sonda sa membranskim imobilisanim DNA, za šta su pogodni sulfati  $M_w = 500\ 000$  g/mol. Pokazano je da dekstran sulfat oslobađa DNA iz DNA-histonskih kompleksa. Dekstran sulfat inhibira vezivanje RNA za ribosome. On je takođe potencijalni inhibitor ribonukleaze i koristi se u izolaciji ribozoma. Dekstran sulfat se koristi sa etilen glikolom u dvofaznoj vodenoj polimernoj separaciji bakterija, virusa, proteina i nukleinskih kiselina. Izučavani su i uticaji na ćelijsku produktivnost. Pokazano je da sa fibrinogenom gradi nerastvorni talog. Dekstran sulfat se vezuje za viruse i inhibira početnu adsorpciju u osetljive ćelije (Kennedy i White, 1983). Interes za ispitivanje ovakvih sulfata polisaharida je veliki pošto se pokazalo da imaju antiviralno dejstvo (ali i antikoagulativno), pa su zbog toga potencijalna jedinjenja za izradu farmaceutskih preparata u terapiji peptičkog čira, HIV-a i sl. (Ricketts, 1952a; Kentaro i Kotaro, 1974). Derivati dekstrana kao što je *karboksimetil*

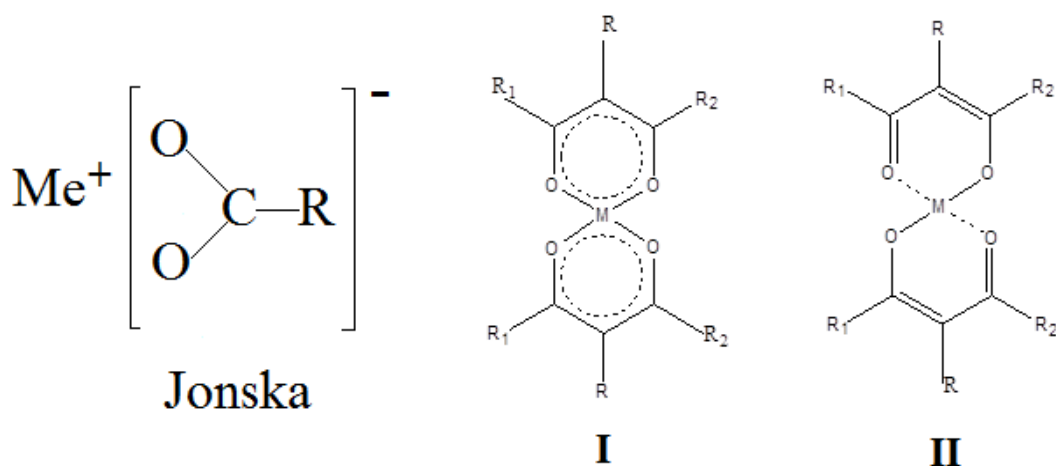


*dekstran (CMD)* ili *dekstran sulfat (DS)* čija je strukturna formula prikazana na Slici 7, ispunjavaju uslove da mogu da sa prelaznim metalima grade kompleksna jedinjenja, ali mogu da imaju ulogu kao redukcion i stabilizirajući agens u sintezi MNPs.



**Slika 7.** Strukturna formula natrijumove soli dekstran sulfata DS

Formiranje kompleksa, ili redukcija jona metala (recimo, srebra), omogućeno je zahvaljujući prisustvu O-donor atoma karboksilnih, odnosno sulfo grupa prisutnih u strukturi. Pri tome se mogu obrazovati kompleksi različitog sastava, odnosno koordinacije (v. Tab. 1) s jedne strane, a sa druge mogu da redukuju jone metala i tako formiraju metalne nanočestice. Pored redukcionih svojstava DS i CMD istovremeno igraju ulogu i kao stabilizirajući agens koji sprečava njihovu agregaciju nanočestica, kako je navedeno u prethodnom naslovu. I DS i CMD mogu da grade kompleksna jedinjenja različite strukture i odnosa metal-ligand sa jonima prelaznih metala (Nadagouda i Varma, 2007). Naime, anjon napred navedenih liganada može sa metalnim katjonom da formira jedinjenja za koja, što se strukture tiče, postoje dve granične mogućnosti: prva da su metalni kompleksi jonski građeni, ili druga da su to helati, pri čemu priroda obrazovanih helatnih prstenova može da bude slična kompleksima β-diketona kada je red veza C-C, C-O i M-O potpuno izjednačen ili, da bude različit, kako je prikazano na Slici 8 sa oznakama II (pretežno jonska) i I (izjednačen red veza, tip β-diketona). Dobar pokazatelj o načinu vezivanja odnosno prirode obrazovanja helatnih prstenova može da bude oblast valentnih CO vibracija kod kompleksa CMD.



**Slika 8.** Helatna struktura metalnih kompleksa  $\beta$ -diketona

Bilo bi moguće obrazovanje različitih tipova kompleksa sa različitim molskim odnosom metal:ligand (1:1, 1:2, 1:3), a ukoliko bi se radilo o kompleksima sa molskim odnosom 1:2, to bi koordinaciona sfera metala do oktaedarske konfiguracije mogla biti dopunjena koordiniranim molekulima vode ili hidroksilnim grupama, ili prisutnim jonima u sistemu.

## 2.7. Lekovita dimnjača *Fumaria officinalis* L

Naziv ove biljke dimnjača (*lat. Fumaria Officinalis* L), potiče od latinske reči *fumus*, što znači dim. To je jednogodišnja zeljasta biljka, iz porodice makova (Papaveraceae).



*Nazivi:* Poznata još po narodnim imenima kao: zemljani dim (zbog soka biljke koji je poput dima koji tera suze na oči), mrkva, morski pelin, rosno zelje, rosna trava, rosica, rosnica, rosopast, runjavac, dimica.

*Opis:* Izrasta u proseku od 10 cm do 50 cm, ređe do 60 cm. Stabljika biljke je uspravna, tanko žiličasta i šuplja, od osnove poprilično i bogato razgranata. Listovi su blago zakrivljeni, sa naizmeničnim listovima izdijeljeni (razdijeljeni) u obliku pera (režnjeve). Cvetovi su nepravilni, sakupljeni (10-15 njih) u grozdaste cvasti na vrhovima grana.



Cvetovi mogu biti beli i ružičasti. Boja varira od svetloružičaste do tamnijih nijansi na krajevima tj. imaju tamniju pegu na vrhu. Cvetovi su dvopolni, dakle sadrže muške i ženske organe, a oprašuju ih i pčele i muve. Plod je ahenija, oraščica sa urezanim vrhom u prečniku od 2 do 2,5

mm, i malo je širi nego duži. Jedna biljka godišnje može da proizvede od 300 do 1600 semenki. Inače, dimnjača se veoma dobro kamuflira među drugom vegetacijom pa je stoga teško pronaći. Često ostane neprimećena od strane insekata, te ima sposobnost da oprašuje samu sebe da bi proizvela seme. Semenke zadržavaju sposobnost da klijaju i nakon 600 godina. Dimnjača cveta od jula do avgusta, a pošto dosta dobro i dugo podnosi mraz, može da se zadrži do kasne jeseni, septembra. Može se pronaći u baštama, poljima, neobrađenim i pustim zemljištima, pored obala. Rasprostranjena je na području skoro cele Evrope, u Zapadnoj Aziji i Severnoj Africi. Prikuplja se u vreme cvetanja nadzemni deo biljke u cvetu (*Fumaria herba*). Suši se u tankom sloju u hladu, da zadrži boju. Karakterističnog je mirisa i gorkog je ukusa. Može se konzumirati kao čaj, sok ili sirup (Watson i Dallwitz, 1992; Stevens; Angiosperm Phylogeny Group, 2003).



*Sastav:* Vodeni ekstrakti *Fumaria officinalis* L, prema podacima iz literature (Glišić i sar., 2016; Ivanov i sar., 2014; Latif i sar., 2012), sadrže alkaloidne, flavonoide, ugljene hidrate, glikozide, tanine, saponine, proteine, steroide i organske aminokiseline koji kandiduju ekstrakt za sintezu AgNPs. Na osnovu dostupne literature možemo zaključiti da ekstrakti *Fumaria officinalis* L, nisu korišćeni za sintezu AgNPs. Imajući ovo u vidu, postupci sinteze AgNPs sa vodenim ekstraktom *Fumaria officinalis* L, kao i njihovom karakterizacijom su opisani u ovom istraživanju. Sadrži alkaloidne do 1 % (*fumarin, protopin, sinaktin, kriptokavin, koridalin*), vitamin C, fumarinsku kiselinu, aurotensin, natrijum, kalijum hlorid, kalijum nitrat, tanin, smolu, šećer, sluz i gorke stvari.

*Primena:* Lekovito delovanje dimnjače je raznovrsno, najpre se koristi kao diuretik, laksativ (pomaže pražnjenje creva) i holagog, što znači da stimuliše povećano lučenje žuči. Posebno se preporučuje u lečenju hroničnih ekcema i daje dobre rezultate u lečenju psorijaze. U narodnoj medicini se ova biljka upotrebljava veoma dugo, čak više nego u savremenoj medicini. U manjim količinama prvenstveno krepi i jača organizam, stimuliše lučenje znoja i

mokraće, utiče na poboljšanje apetita. Normalizuje rad želudačnog-crevnog sistema (prilikom zatvora, grčeva i gasova), žuči i jetre. Pomaže kod šećerne bolesti, arterioskleroze, hemoroida, čisti krv, poboljšava krvnu sliku u periodu 8 dana (umnožava crvena krvna zrnca - eritrocite), ali ako se uzima duže od preporučenog, narušava krvnu sliku. U malo većim količinama izaziva bolove i proliv.

*Napomena:* Narodni lekari su bili veoma obazrivi sa dimnjačom, stabljika je otrovna zbog fumarina koji sadrži. Na pacijente deluje vrlo različito u različitim dozama. Prevelika količina je uvek fatalna (smrtonosna), jer zaustavlja (parališe) respiratorni sistem. Ne preporučuje se u toku trudnoće i dojenja.

## **2.8. Metode karakterizacije i strukturne korelacije kompleksa i nanočestica srebra**

Koordinacija i struktura nagrađenog kompleksnog jona, nastalog kao rezultat interakcije metala i liganda, zavisi od prirode centralnog jona metala (vrednosti energije jonizacije, popunjenosti d-podnivoa, jonskog radijusa, polarizabilnosti) i prirode liganda (naelektrisanje, jačina ligandnog polja, dužina veze metal-ligand). Sve ove osobine jona metala i liganda uslovljavaju različitu geometriju kompleksnog jona koja se može utvrditi spektroskopskim ispitivanjima. Odgovarajući izdvojeni produkti interakcije metal-ligand se razlikuju po boji, sadržaju metala i stabilnosti, što se može utvrditi različitim fizičko-hemijskim metodama analize.

### **2.8.1. UV-Vis spektrofotometrija**

UV-Vis spektrofotometrija obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetnog zračenja (EMZ) od strane atoma, jona ili molekula u oblasti između 200 i 900 nm. Rezultati dobijeni primenom aproksimativnih metoda kvantne hemije pri proučavanju ovih spektara, ukazali su na izvanredne mogućnosti za detaljnije proučavanje jonskih stanja i strukture molekula, jona i kompleksa, kao i za karakterizaciju hemijskih veza u njima.

Većina standardnih UV-Vis spektrofotometara radi u delu elektromagnetnog spektra između 200 i 800 nm. Taj deo je podeljen na blisku ultraljubičastu (200-400 nm) i vidljivu oblast (400-800 nm). Inače, priroda interakcije zračenja sa molekulom jednaka je u obe oblasti. Na

nižim talasnim dužinama ( $< 200$  nm) nalazi se takozvana vakuumska ultraljubičasta oblast, koja nije od interesa za strukturna određivanja. Energetski sadržaj zračenja u oblasti od 200 do 800 nm nalazi se između 600 i 150  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , što je dovoljno za pobuđivanje elektrona i njihov prelaz iz osnovnih stanja u pobuđena stanja:  $E$  ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) =  $1,19\cdot 10^5/\lambda$  (nm). Zbog toga što UV-Vis zračenje apsorbuju elektroni, ova vrsta spektroskopije nosi naziv i elektronska spektroskopija. Intenzitet apsorpcije zračenja definisan je jednačinom 1 koja je izvedena iz Lamber-Berovog zakona (Mišović i Ast, 1989):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

gde je:  $A$  - apsorpcija,  $I_0$  - intenzitet upadnog zraka,  $I$  - intenzitet zraka po prolasku kroz uzorak,  $c$  - količinska koncentracija ( $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ),  $\varepsilon$  - molarna apsorptivnost (molarni ekstinkcioni koeficijent),  $d$  - dužina putanje zraka kroz uzorak (dm).

Svaki apsorpcioni maksimum okarakterisan je talasnom dužinom ( $\lambda_{\text{max}}$ ) na kojoj se nalazi, kao i molarnom apsorptivnošću ( $\varepsilon$ ) na toj talasnoj dužini. Intenzitet apsorpcije ( $\varepsilon$ ) upravo je proporcionalan verovatnoći elektronskog prelaza i veličini sistema koji apsorbuje. O verovatnoći (kreće se između 0 i 1) govore kvantno-mehanička selekciona pravila, koja se zasnivaju na simetriji orbitala osnovnih i pobuđenih stanja, kao i na spinskim multiplernostima. Na osnovu selekcionih pravila postoje takozvani dozvoljeni prelazi (verovatnoća = 1) i zabranjeni prelazi (verovatnoća = 0). Od dozvoljenih prelaza potiču i najintenzivniji apsorpcioni maksimumi ( $\varepsilon > 10.000$ ). Elektronski prelazi koje zabranjuju selekciona pravila često se ipak javljaju u spektru, samo je intenzitet njihove apsorpcije veoma mali. Prelazi se dešavaju zbog toga što su simetrijska svojstva koja ih striktno zabranjuju narušena molekulskim vibracijama, i/ili supstitucijom. Elektronski spektri u oblasti 200-800 nm nastaju prelazima elektrona koji obuhvataju  $\sigma$ ,  $\pi$  i nevezivne (n) molekulske orbitale. Jedinjenja koja sadrže grupu sa nevezivnim elektronima ispoljavaju apsorpciju koja je povezana sa prelazima  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  tipa. Za jedinjenja prelaznih metala s delimično popunjenim d-podnivoima karakteristični su  $d \rightarrow d$  prelazi, koji se javljaju u Vis spektralnom području. Spektrofotometrijske metode imaju veoma važnu ulogu u ispitivanju mehanizma reakcija kompleksiranja, određivanju sastava kompleksa, koncentracija apsorbujućih supstanci, određivanju ravnotežnih i konstanti stabilnosti kompleksa, ispitivanju kinetike reakcija itd. UV-Vis spektrofotometrija pruža bitne podatke pri ispitivanju

koordinacionih jedinjenja prelaznih metala. To je važna tehnika u ispitivanju reakcija kompleksiranja d-metala.

Ovom spektrofotometrijskom tehnikom se iz odgovarajućih apsorpcionih spektara dobijaju podaci o (Lever, 1987):

- odnosu metal:ligand,
- vrsti elektronskih prelaza, kao i za karakterizaciju hemijskih veza u njima,
- energiji cepanja d-energetskih podnivoa,
- geometrijskom rasporedu liganada oko centralnog metalnog jona,
- simetrijskim karakteristikama kompleksa,
- prisustvu izomera u ispitivanom rastvoru kompleksa i
- jačini i tipu veze metal-ligand.

U slučaju MNPs metode UV-Vis spektrofotometrije se primenjuju za praćenje toka sinteze, veličine i stabilnosti čestica. U slučaju kompleksa Cu i Co sa DS i CMD, kao i AgNPs korišćene su sledeće metode karakterizacije:

### **2.8.1.1. Metoda kontinualnog variranja (Jobb-ova metoda)**

*Metoda kontinualnog variranja (Jobb-ova metoda)* najčešće se upotrebljava za određivanje sastava i stabilnosti kompleksa u rastvoru. Metodu je prvobitno opisao Ostromisalensky 1910. godine, a njene principe utvrdio Denison 1912. godine, ali generalno se ova metoda pripisuje P. Jobb-u, koji je 1928. godine objavio detaljnu primenu metode u proučavanju velikog broja koordinacionih jedinjenja. Ova metoda nije univerzalna i može se primeniti samo ako su zadovoljeni sledeći uslovi:

1. kompleks se ponaša u skladu sa Berovim zakonom apsorpcije,
2. u sistemu se gradi samo jedan mononuklearni kompleks,
3. kompleks se gradi po datoj jednačini, tj. ne postoje nikakve sporedne reakcije (protonovanje liganada ili hidroliza jona metala) i
4. jonska sila rastvora je konstantna u toku merenja.

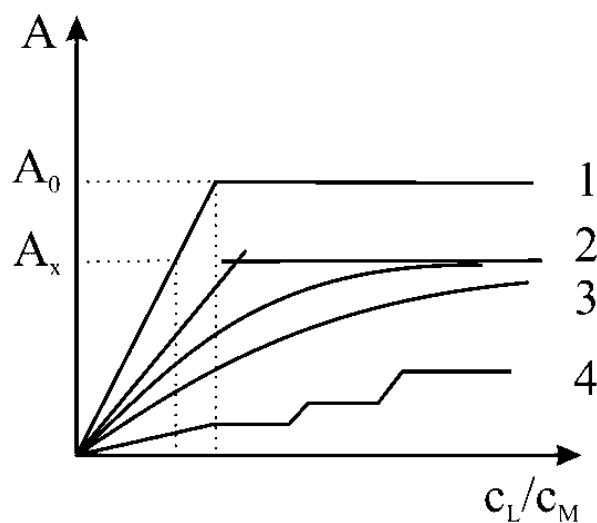
Za reakciju tipa  $mM + nL \leftrightarrow M_mL_n$ , gde je M jon metala, a L ligand, metoda se sastoji u tome da se napravi serija rastvora odmeravanjem različitih zapremina ekvimolarnih rastvora jona metala i liganda i to tako da je ukupna koncentracija,  $c_{tot} = c_M + c_L$ , konstantna. Konstantna je i ukupna zapremina rastvora, a menja se odnos koncentracija metala i liganda,  $c_M/c_L$ . Zatim se meri apsorbanca ovih rastvora pri konstantnim vrednostima jonske sile i pH. Merenja se izvode na talasnoj dužini na kojoj nagrađeni kompleks pokazuje maksimum apsorpcije. Da li se u rastvoru gradi samo jedan kompleks, a ne smeša kompleksa, može se proveriti na dva načina:

1. meri se apsorbanca na više talasnih dužina u oblasti apsorpcionog spektra kompleksa; ako merenja na svim talasnim dužinama daju isti rezultat izračunavanja, može se zaključiti da se gradi samo jedan kompleks,
2. eksperiment se izvodi sa više različitih ukupnih koncentracija,  $c_{tot}$ , ukoliko se gradi samo jedan kompleks maksimum apsorpcije se uvek nalazi na istoj talasnoj dužini.

Meri se apsorbanca na  $\lambda_{max}$ . Zavisnost A u funkciji od molskog udela metala ili liganda ima karakterističan maksimum apsorbanca, odnosno koncentracije kompleksa. Projekcija te tačke na apscisu daje molski odnos metal-ligand u kompleksu. Konstanta stabilnosti izračunava se povlačenjem tangenti kroz bočne grane krive. Tačka u kojoj se seku tangente daje odnos metal:ligand u kompleksu.

### 2.8.1.2. Metoda molskih odnosa

*Metoda molskih odnosa* sastoji se u merenju apsorbanca serije rastvora u kojima se koncentracija jedne komponente održava konstantnom (obično metala), a koncentracija druge komponente se menja tako što se polazi od nižih koncentracija ka višim u odnosu na prvu komponentu. Apsorbanca rastvora meri se na određenoj talasnoj dužini i grafički se predstavlja u zavisnosti od odnosa stehiometrijskih koncentracija liganda i metala:  $A=f(c_L/c_M)$ . Krive zavisnosti mogu imati različite oblike (v. Sl. 9). Ako se obrazuje samo jedan stabilan kompleks (kriva 1) onda apsorbanca rastvora raste linearno sa molskim odnosom i postaje konstantna, što odgovara potpunom vezivanju jona metala u kompleks, te dalji dodatak liganda ne izaziva promene apsorbanca. Tačka preloma krive određuje odnos metala i liganda u kompleksu.



Slika 9. Grafik funkcije  $A=f(c_L/c_M)$ -metoda molskih odnosa

Kada je disocijacija kompleksa mala dobija se kriva 2, a broj liganada u kompleksu određuje se iz preseka tangenti na početni i završni deo krive. Ako je disocijacija kompleksa jako velika, horizontalni deo krive se ne dostiže, čak i ako je ligand u znatnom višku (kriva 3). U slučaju obrazovanja većeg broja kompleksnih jedinjenja, kada su razlike konstanti stabilnosti dovoljno velike, javlja se veći broj prevoja odakle se dobija i stehiometrijski odnos metala i liganda u kompleksima (kriva 4).

## 2.8.2. Interpretacija UV-Vis spektara ispitivanih metala

Elektronski prelaz iz osnovnog terma u neko pobuđeno stanje, zapaža se po promeni elektronskog spektra u vidljivoj i bliskoj ultraljubičastoj oblasti kompleksa jona prelaznih metala. Kod kompleksa d-metala javljaju se d-orbitalni prelazi, koji se još nazivaju i  $d \rightarrow d$  prelazima. Kod MNPs se očekuju trake od tzv, SPR prelaza u vidljivoj oblasti.

### 2.8.2.1. Elektronska struktura i spektri Co(II)-jona u kompleksnim jedinjenjima

Co(II)-jon ( $d^7$  elektronska konfiguracija) gradi najveći broj tetraedarskih kompleksa od svih jona prelaznih metala i serije, što je verovatno posledica samo neznatne razlike koja postoji u



energiji stabilizacije u ligandnim poljima  $T_d$  i  $O_h$  simetrije za jon. Pored kompleksa tetraedarske strukture isti može da gradi i komplekse kvadratno-planarne i oktaedarske strukture. U oktaedarskom okruženju sa ligandima Co(II)-jon gradi kompleksna jedinjenja sa koordinacionim brojem 6, koja mogu imati jednu od dve moguće konfiguracije jona  $d^7$  i to:  $(t_{2g})^5 (e_g)^2$  u slabom ligandnom polju, ili  $(t_{2g})^6 (e_g)^1$  sa ligandima jakog polja deformisane  $O_h$  strukture. Kompleksna jedinjenja ovog jona su dosta spektroskopski proučavana (Defazio i Cini, 2002; Tsiliou i sar., 2012). Sa ligandima tipa karboksilata ovaj jon gradi komplekse tipa  $[ML]^+$ ,  $[ML_2]$ ,  $[ML_3]^-$ .

Rastvori oba kompleksa ( $O_h$  i  $T_d$ ) apsorbuju u Vis oblasti spektra i prema tome biće obojeni. Oktaedarski Co(II)-jon ima ružičastu boju, dok tetraedarski ima intenzivnu plavu boju. Boja oktaedarskog kompleksa potiče od prelaza  ${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$ . Traka oko  $8000-10000\text{ cm}^{-1}$  može se pripisati prelazu  ${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4A_{2g}$ . Osim nje u vidljivoj oblasti oko  $20000\text{ cm}^{-1}$  manifestuje se traka sa multipletnom strukturom koja odgovara prelazu  ${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4A_{2g}$ . Prelaz  ${}^4A_{2g}$  je veoma slab i često se manifestuje u vidu prevoja, i zapaža se u vidu veoma slabe apsorpcije oko  $12000\text{ cm}^{-1}$ . Kod tetraedarskih i pseudotetraedarskih kompleksa Co(II)-jona javljaju se prelazi  ${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(F)$  i  ${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(P)$  koji se manifestuju u vidu multipliteta u bliskoj IR i vidljivoj oblasti.

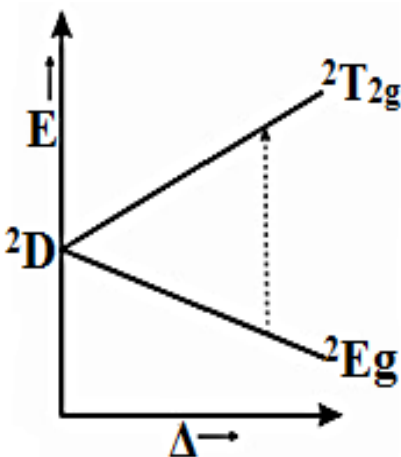
Na osnovu intenziteta ovih traka jasno se razlikuju tetraedarski i oktaedarski kompleksi Co(II)-jona. Položaji apsorpcionih maksimuma Co(II)-jona u  $O_h$  i  $T_d$  ligandnom polju, kao i odgovarajući prelazi elektrona prikazani su u Tabeli 4 (Jørgensen, 1954; Nikolić i sar., 2010; Drago, 1981; Lever, 1987; Milić, 1998).

**Tabela 4.** Položaji apsorpcionih maksimuma u spektrima i odgovarajući prelazi elektrona jona  $d^7$  konfiguracije u  $O_h$  i  $T_d$  ligandnom polju

$O_h$ ligandno polje		$T_d$ ligandno polje	
Prelaz	Intenzitet [nm]	Prelaz	Intenzitet [nm]
${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4T_{2g}(P)$	$\sim 1\ 200$	${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_2$	$< 2\ 000$
${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4A_{2g}$	$\sim 560$	${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(F)$	$\sim 1\ 250 - 2\ 500$
${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$	$\sim 560$	${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(P)$	$\sim 700$

### 2.8.2.2. Elektronska struktura i spektri Cu(II)-jona u kompleksnim jedinjenjima

Osnovni term Cu(II)-jona je  $^2D$  koji se u ligandnom polju  $O_h$  ili  $T_d$  strukture cepa na  $^2E_g$  i  $^2T_{2g}$ , odnosno E i T<sub>2</sub> nivoe, respektivno. Uprošćeni dijagram energetske nivoa Cu(II)-jona prikazan je na Slici 10. Konfiguracija Cu(II)-jona u kristalnom polju je  $(t_{2g})^6 (e_g)^3$ , pa su odgovarajući kompleksi u kojima isti koordinira sa 6 liganada ili 6 donor atoma polidentatnih liganada jako deformisani i veze Cu-L sa ligandima u trans-položaju mnogo duže nego ostale četiri veze Cu-L. Na osnovu ovoga proizilazi da simetrija nastalih kompleksa opada do tipa  $D_{4h}$ , što je posledica Jan-Telerovog efekta. Apsorpcioni spektri jona Cu(II) u vodenom rastvoru nemaju jednu simetričnu apsorpcionu traku već nekoliko bliskih traka koje se prekrivaju. Razlika u energiji prelaza  $t_{2g} \rightarrow e_g$  u kompleksu Cu(II)-jona pravilne  $O_h$  strukture je u intervalu od oko  $13000 \text{ cm}^{-1}$  za komplekse gde je Cu(II)-jon u koordinaciji sa O-donor atomima, do oko  $18000 \text{ cm}^{-1}$  za komplekse gde je Cu(II)-jon u koordinaciji sa N-donor atomima.



**Slika 10.** Uprošćeni dijagram energetske nivoa jona  $d^9$  konfiguracije u  $O_h$  ligandnom polju

Kod kompleksa Cu(II)-jona sa O-donor ligandima  $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$  dolazi do pojave široke apsorpcione trake u oblasti  $13000\text{-}20000 \text{ cm}^{-1}$ . Slabije apsorpcione trake kod kompleksa sa O-donor ligandima u odnosu na one sa N-donor ligandima, objašnjavaju se pojavom prelaza sa prenosom naelektrisanja metal-ligand, pored  $d \rightarrow d$  prelaza, čija je frekvencija dosta niža od

drugih i koja daje veći deo intenzivnosti  $d \rightarrow d$  prelazu, koji prekriva apsorpcionu traku (Lever, 1987). Kompleksi Cu(II)-jona vrlo niske simetrije u UV-Vis spektru daju slabe apsorpcione trake. Ukoliko su tetragonalno deformisani, u UV-Vis spektru njih karakteriše pojava većeg broja apsorpcionih traka u odnosu na pravilnu  $O_h$  koordinaciju. Kompleksi Cu(II)-jona kvadratno - planarne strukture i strukture bliske njoj ne apsorbuju u oblasti ispod  $10000 \text{ cm}^{-1}$  (Жарский i Новиков, 1988; Drago, 1981).

### 2.8.3. Izračunavanje energije cepanja kristalnim poljem

Jačanje veze metal-ligand povećava energiju cepanja, dok odbijanje elektrona veze metal-ligand smanjuje energiju cepanja. Na osnovu frekvencije apsorpcionog maksimuma trake u Vis spektru kompleksa, može se izračunati energija cepanja kristalnim poljem ( $\Delta$ ). Odgovarajući izraz je:

$$\Delta = h \cdot \nu = h \cdot c/\lambda \quad (2)$$

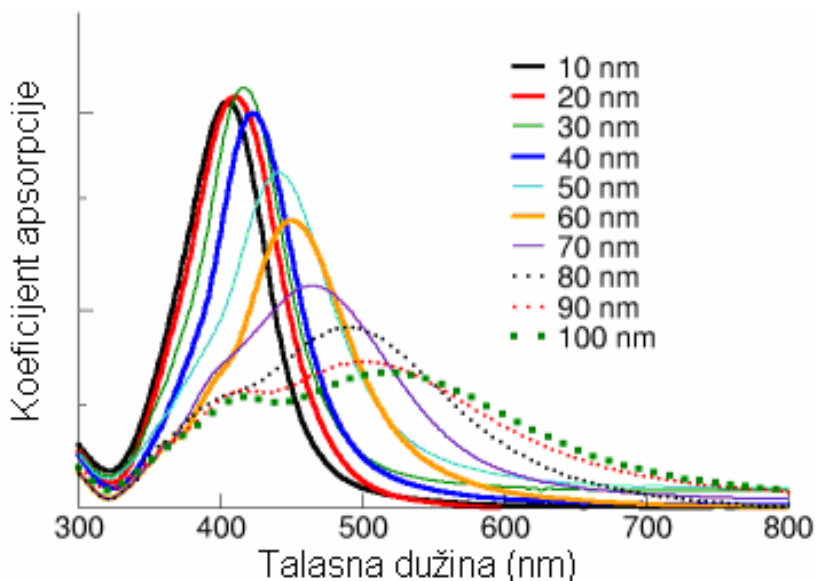
gde je:  $h$  - Planck-ova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ ),  $\nu$  - frekvencija ( $\text{s}^{-1}$ ),  $c$  - brzina svetlosti ( $3 \cdot 10^{10} \text{ cms}^{-1}$ ),  $\lambda$ - talasna dužina (cm).

### 2.8.4. Interpretacija UV-Vis spektara ispitivanih nanočestica srebra

#### 2.8.4.1. UV-Vis karakteristike nanočestica srebra

Kada elektromagnetno zračenje, tj. foton pada na metalnu nanočesticu, dolazi do rasejanja ili apsorpcije zračenja, što prvenstveno zavisi od veličine nanočestice (Nikolić i sar., 2008). Rasejanje se javlja kod većih nanočestica (veličine nekoliko desetina nm) i predstavlja elastični proces (sa neznatnim prenosom energije), pri čemu se pravac fotona menja usled interakcije sa nanočesticom. Kod manjih nanočestica veća je verovatnoća da će doći do apsorpcije. Apsorpcija fotona može izazvati internu ekscitaciju ili fotojonizaciju. Pri internoj ekscitaciji energija fotona prenosi se na neki od slobodnih elektrona unutar nanočestice koji prelazi u pobuđeno stanje sa višom energijom. Ukoliko foton poseduje dovoljnu energiju

( $h\nu > E_i$ ) dolazi do fotojonizacije, tj. izbijanja slobodnog elektrona iz najviše elektronske ljuske. Energija  $E_i$  se naziva energija jonizacije. Kod materijala makroskopskih razmera vrednost energije potrebna za jonizaciju naziva se radna funkcija. Kako je energija jonizacije funkcija veličine nanočestice, može se koristiti izvor monohromatske svetlosti (laser, monohromator) promenljive frekvencije (energije), za određivanje ovog praga, kako bi se odredila veličina nanočestice. Druga strategija je korišćenje monohromatske svetlosti fiksne frekvencije (koja prelazi prag jonizacije) i merenje kinetičke energije izbijenih elektrona. U ovom procesu, elektroni se pobuđuju iz niza zauzetih energetske nivoa u nanočestici i spektar kinetičke energije emitovanih elektrona daje informacije o gustini stanja energetske nivoa u nanočestici. Međutim, najznačajniji efekat do kojeg dolazi interakcijom elektromagnetnog talasa i metalnih nanočestica je površinska plazmonska rezonanca, koja se ne javlja kod objekata makroskopskih razmera. Ona predstavlja kolektivno oscilovanje slobodnih elektrona unutar nanočestice pobuđenih elektromagnetnim poljem. Ove rezonantne oscilacije se kod čestica nekih metalnih nanočestica javljaju u vidljivom delu spektra elektromagnetnih talasa, tako da se može govoriti o svetlosnom talasu, pa u UV spektru postoji apsorpciona traka čiji položaj zavisi pre svega od veličine čestice. Pri sintezi se menja i boja, jer je ovo područje žuto-braon boje. Postoje različite metode određivanja veličine, jedna od njih bazira se na korelaciji sa položajem apsorpcionog maksimuma (Bindhu i Umadevi, 2013; Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013; Quelemes i sar., 2013; Hamedi i sar., 2012; Ahmad i sar., 2011; Aihara i sar., 1998). Inače, kao rezultat SPR prelaza se očekuje traka u UV spektru (ova se u žargonu naziva SPR traka) u oblasti od 370 do 450 nm. Na Slici 11 prikazan je apsorpcioni spektar nanočestica srebra u zavisnosti od njihove veličine. Sa slike se može uočiti da povećanje prečnika nanočestica od 10 do 100 nm dovodi do pomeranja apsorpcionog maksimuma od 400 nm ka 500 nm. Kod većih čestica (veličine preko 80 nm) dipolna aproksimacija više ne važi i javlja se sekundarni maksimum na nižim talasnim dužinama, koji je posledica četvoropolne rezonance. Pod stabilnošću nanočestica u rastvorima se podrazumeva zadržavanje čestica u dispergovanom stanju i posle protoka dužeg perioda vremena. Stabilnost nanočestica u disperziji opisuje DLVO teorija, nazvana po četiri naučnika Derjaguin, Landau, Verwey i Overbeek.



**Slika 11.** Apsorpcioni spektar nanočestica srebra u zavisnosti od njihovog prečnika

[<http://nanocomposix.eu/>]

Između dispergovanih čestica javljaju se odbojne elektrostatičke i Van der Valsove privlačne sile. Van der Valsove sile se javljaju između momenata električnih dipola atoma ili molekula. Sila između dva dipola veoma brzo slabi sa rastojanjem ( $1/r^3$ ). Usled termalnog kretanja i rotacije dipola, njihova interakcija postaje slabija sa porastom rastojanja. Iako su Van der Valsove sile takođe elektrostatičke prirode, (dipol-dipol ili dipol-indukovani dipol) veoma su kratkog dometa ( $1/r^6$ ) i javljaju se samo među česticama koje su u direktnom kontaktu. Ukoliko se nanočestice nađu na ovako malom međusobnom rastojanju, privlačne sile preovladaju i potrebno je uložiti veliku energiju za njihovo razdvajanje. Ova pojava nagomilavanja nanočestica zove se aglomeracija. Metalne nanočestice ( $M_n^0$ ) ne poseduju višak naelektrisanja. Ipak, na površini nanočestice mogu se javiti indukovana naelektrisanja ( $\delta^+$ ), osiromašenjem površinskog sloja elektronima, usled adsorpcije  $X^-$  jona (ili molekula sa funkcionalnim grupama koje imaju višak naelektrisanja). Nanočestica tako postaje anjonska  $M_n^0 \cdot X_m^{m-}$ . Ovako obrazovane naelektrisane čestice su istog polariteta i međusobno se odbijaju usled elektrostatičke interakcije. Negativne čestice privlače čestice suprotnog (pozitivnog) naelektrisanja, formirajući zajedno sa indukovanim naelektrisanjima električni dupli sloj na površini čestice (Puntarić, 2014). Karboksimetil dekstran, poseduje negativno naelektrisane karboksilne grupe za koje se pretpostavlja da mogu elektrostatički da interaguju

sa  $\text{Ag}^+$  jonima kako bi formirale kompleks. Slično je primećeno kod hijaluronske kiseline i AgNPs (Shipway i sar., 2000; Delić, 2011; Bednar, 2014; Stojanović i sar., 2009). Pored toga, na površinsku plazmonsku rezonancu značajno utiče i oblik nanočestica. Unutrašnje indukovano električno polje srazmerno je višku naelektrisanja akumuliranog na površini nanočestice, tako da je u direktnoj vezi sa dimenzijama nanočestice u pravcu električnog polja svetlosti (normalno na pravac propagacije svetlosnog talasa).

Elektronski spektri u ovom području EMZ nastaju prelazima elektrona koji obuhvataju  $\sigma$ ,  $\pi$  i nevezivne ( $n$ ) molekulske orbitale. Jedinjenja koja sadrže grupu sa nevezivnim elektronima ispoljavaju apsorpciju koja je povezana sa prelazima  $n \rightarrow \sigma^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$  tipa. Za jedinjenja prelaznih elemenata s delimično popunjenim d-podnivoima karakteristični su  $d \rightarrow d$  prelazi, koji odgovaraju uglavnom Vis spektralnom području i daju slabe apsorpcione trake.

Uvođenjem karboksimetil grupe, odnosno sulfo grupe kao hromofornih grupa u strukturu dekstrana, nastaju CMD i DS pa bi se u njihovim UV-Vis spektrima očekivale apsorpcione trake od  $\pi \rightarrow \pi^*$  prelaza (na oko 180 nm) i  $n \rightarrow \pi^*$  (na oko 270 nm). Ove trake se najverovatnije zbog slabog intenziteta ne mogu uočiti. Međutim, kod kompleksa Cu-DS i Co-DS u ovoj oblasti bi se očekivala promena u intenzitetu i položaju ovih traka ako bi ove grupe učestvovala u koordinaciji, odnosno pojava interakcija ligand-metal, tj. formiranje koordinativne veze, pa eventualne promene mogu da služe kao kriterijum uspešnosti sinteze.

### 2.8.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Atomi i molekuli nisu statični, oni se nalaze u stanju neprekidnog vibriranja. U zavisnosti od njegove složenosti i geometrije, svaki molekul je okarakterisan određenim brojem vidova vibracije. Svaki vid vibracije ima svoju vibracionu frekvenciju koja zavisi od masa atoma i jačine veze između njih. Neke od molekulskih vibracija su karakteristične za molekul kao celinu, dok su druge odraz prisustva određenih funkcionalnih grupa u njemu. Važno je odmah napomenuti da neke od funkcionalnih grupa pokazuju istu ili vrlo sličnu vibracionu frekvenciju bez obzira na strukturu ostataka molekula. Ova osobina čini osnov za primenu infracrvene spektrofotometrije u analitičke svrhe. Vibraciona frekvencija se obično izražava kao talasni broj čije su jedinice  $\text{cm}^{-1}$ . Izražena na ovaj način, frekvencija predstavlja recipročnu vrednost talasne dužine  $\lambda$  izražene u centimetrima. Pošto se u infracrvenoj

spektrofotometriji, talasne dužine izražavaju najčešće u mikrometrima ( $1 \text{ cm}^{-1} = 10^4 \text{ } \mu\text{m}$ ), odnos između frekvencije i talasne dužine dat je izrazom (3):

$$\nu (\text{cm}^{-1}) = 10^4 / \lambda (\mu\text{m}) \quad (3)$$

Talasne dužine molekularnih vibracija nalaze se u infracrvenoj oblasti spektra elektromagnetnog zračenja. Ova oblast se proteže od 0,75 do 400  $\mu\text{m}$ . Od najvećeg praktičnog interesa za analitičare je uska oblast od 2,5 do 15,0  $\mu\text{m}$  ili izraženo u jedinicama frekvencije od 4000 do 666  $\text{cm}^{-1}$ . Organski molekuli mogu da apsorbuju zračenje u ovoj oblasti i da apsorbovanu energiju pretvore u vibracionu energiju. Ova apsorpcija je kvantizirana (molekul može da apsorbuje samo one frekvencije zračenja koje se poklapaju sa vibracionim frekvencijama unutar molekula). Poređenjem intenziteta ulaznog i izlaznog zraka dobija se infracrveni apsorpcioni spektar uzorka (ove spektre skraćeno nazivamo IR spektrima, od eng. *infra-red* = infracrveni). Apсорpcija određene frekvencije zračenja dovodi do pobuđivanja odgovarajuće vibracije. Nakon prestanka dejstva zračenja, pobuđeni molekul se vraća u prvobitno stanje, pri čemu se apsorbovana energija oslobađa kao toplota (Barker i sar., 1953). U hemiji koordinacionih jedinjenja IR spektroskopija je nezamenjiva metoda u proučavanju koordinacije metal-ligand (M-L), pogotovu u slučajevima kada se menja simetrija liganda zbog vezivanja za jon metala. Sa opadanjem simetrije liganda povećava se broj apsorpcionih traka ili se usled preraspodele elektronske gustine u molekulu liganda pri koordinaciji trake pomeraju i menjaju intenzitet u IR spektru nastalog proizvoda. Na taj način se preko IR spektara mogu proučavati interakcije M-L i priroda veze u koordinacionim jedinjenjima. Valentne vibracije veze metal-ligand, važne za koordinacionu hemiju, registruju se u dalekoj IR oblasti. Kada se kroz prostor ispunjen nekom supstancom (u bilo kom agregatnom stanju) propusti snop IR zračenja, koji se zatim optičkom prizmom (ili rešetkom) razloži na monohromatske komponente, primećuje se (pomoću odgovarajućeg detektora) da na pojedinim frekvencijama dolazi do većeg ili manjeg slabljenja jačine svetlosti. Razlog ove pojave je selektivna apsorpcija IR zračenja od strane molekula koji sa tim zračenjem dolaze u dodir. Ako se promena intenziteta propuštenog IR svetla predstavi u zavisnosti od frekvencije (i/ili talasne dužine) dobija se infracrveni spektar. IR spektar se najčešće meri automatski, pomoću infracrvenog spektrofotometra kao zavisnost transparentije ( $T$ ) od talasnog broja ( $\bar{\nu}$ ) i/ili talasne dužine ( $\lambda$ ). Transparentija, odnosno svetlosna propustljivost, jeste količnik intenziteta propuštenog ( $I$ ) i upadnog zraka ( $I_0$ ) i izražava se u procentima (Mitić i sar., 2009):

$$\%T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Talasni broj je recipročna vrednost talasne dužine izražene u cm:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (5)$$

gde je  $\bar{\nu}$  - talasni broj ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu$  - frekvencija (Hz),  $\lambda$  - talasna dužina (cm),  $c$  - brzina svetlosti ( $3 \cdot 10^{10} \text{ cm s}^{-1}$ ).

Na frekvencijama na kojima dolazi do apsorpcije zračenja javljaju se apsorpcioni maksimumi (minimumi propustljivosti), koji se posmatraju odozgo na dole. Oni se nazivaju i *apsorpcionim trakama*. Kako je izgled IR spektra (položaj, intenzitet, broj i oblik apsorpcionih maksimuma) u direktnoj vezi sa strukturom molekula, to je on veoma karakterističan za svako jedinjenje. Zbog toga je za ovu vrstu spektra i uobičajen naziv "otisak prsta molekula". Talasne dužine koje zahvata kompletna IR oblast nalaze se između vidljivog ( $\sim 800 \text{ nm}$ ) i mikrotalasnog ( $\sim 1 \text{ mm}$ ) dela spektra EMZ. Na osnovu vrste energetskih prelaza koji se pobuđuju apsorpcijom zračenja, ova celokupna oblast je podeljena na tri dela. Za hemiju je najinteresantniji deo takozvane srednje (ili osnovne vibracione) IR oblasti, koji se nalazi između približno  $2,5$  i  $15 \text{ }\mu\text{m}$  ( $4.000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ ). Apсорpcija zračenja u IR oblasti odgovara energetskim prelazima reda veličine  $8,5\text{-}41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Zračenje sa ovim energetskim sadržajem se poklapa sa frekvencijama valencionih i deformacionih vibracija (Mitić, 2008). Najintenzivniji maksimumi u IR spektrima potiču od apsorpcije polarnih veza ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}-\text{O}$ ,  $\text{N}=\text{O}$  itd.) (Vasko i sar., 1971). Pomoću IR spektara može da se sagleda snažan potencijal infracrvene spektroskopije kao metode za identifikaciju funkcionalnih grupa organskih jedinjenja. IR spektar često pruža informacije i o drugim detaljima strukture molekula, koje mogu biti od velike pomoći pri njegovoj identifikaciji. Takve informacije su, na primer, prisustvo vodonične veze, konjugovanost strukture, dimenzije prstena, razgranatost strukture, broj supstituenata i sl. Jedna od veoma važnih karakteristika infracrvene spektroskopije jeste njena sposobnost za razlikovanje izomera: na primer 1,2- i 1,3-dibrompropana, kao i orto-, meta- i para-ksilola koji daju veoma različite IR spektre na osnovu kojih je moguća njihova identifikacija. Proučavanjem samo IR spektara nepoznatog jedinjenja retko se može dobiti konačan odgovor u smislu njegove potpune identifikacije. U tu svrhu kombinuju se informacije dobijene masenom spektrometrijom, NMR analizom i UV-spektrofotometrijom. IR spektroskopija danas je u velikoj meri potisnula klasične metode



kontrole i praćenja proizvoda pri sintezi u organskoj laboratoriji (Barker i sar., 1953). U slučaju polisaharida i njihovih derivata sa različitim funkcionalnim grupama, IR spektroskopija može uspješno da se primenjuje za ispitivanje interakcija sa jonima metala, pošto kompleksiranje, obrazovanje jonskih jedinjenja ili postojanje drugih interakcija između funkcionalne grupe i metala je praćeno promenom položaja, oblika i intenziteta odgovarajućih traka funkcionalnih grupa. Analiza infracrvenih spektara sintetisanih jedinjenja može se vršiti na empirijski način tj. na osnovu literaturnih podataka i međusobnim upoređivanjem spektara polaznih jedinjenja dekstrana, karboksimetil dekstrana i kompleksa. Infracrveni spektar dekstrana je bio predmet mnogobrojnih ispitivanja (Cakić i sar., 2008; Nikolić i sar., 2009; Mitić i sar., 2009; Nikolić i sar., 2008; Mitić i sar., 2007; Mitić, 2008; Vasko i sar., 1971; Barker i sar., 1953). Izučavanjem spektralnih oblasti polisaharida, pa tako i dekstrana i CMD mogu da se dobiju podaci o sadržaju  $\alpha$ -1,6 veza, (ali i drugih veza  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4), informacije o prisustvu molekula vode u strukturi, tipu i načinu vezivanja molekula vode (v. Tab. 5), a pored interakcija intra- ili intermolekulskog tipa i konformacije glukopiranozne jedinice (koja kao što je poznato ima 6 forme), izmene konformacije prstena, tj. prostornog rasporeda OH i CH<sub>2</sub>OH grupa (rotacija oko C-O i C-C veza), stepenu linearnosti i kristalčnosti polimera itd. Spektralne oblasti čijim se izučavanjem mogu dobiti napred iznesene informacije su prikazane u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Primena FTIR spektroskopije u ispitivanju strukturnih izmena polisaharida

Vodonična veza	Konformacija CH <sub>2</sub> OH grupe	Konfiguracija CH grupe	Orijentacija i kristalizacija	Konformacija prstena
3700-3000 cm <sup>-1</sup>	1450-1300cm <sup>-1</sup>	1000-700 cm <sup>-1</sup>	1000-400 (or.) cm <sup>-1</sup>	1000-700 cm <sup>-1</sup>
700-400 cm <sup>-1</sup>	3000-2800 cm <sup>-1</sup>		1000-700 (kr.) cm <sup>-1</sup>	3600-3550 cm <sup>-1</sup>
200-100 cm <sup>-1</sup>			3000-2800 cm <sup>-1</sup>	
-niskotemperaturni spektri -dihroizam $\nu$ (OH) -izotopska izmena sa D <sub>2</sub> O	-niskotemperat. spektri -temper. spektri plastif. uzoraka	925-885 ax-ax 885-860 ax-eq 855-825 eq-ax 825-790 eq-eq	dihroizam amorfne orijentacije i kristalizacije	-tip intramolekul. vodonične veze -stermi faktori -prost. rasp. OH -aksijalni i ekvatorijalni položaj CH

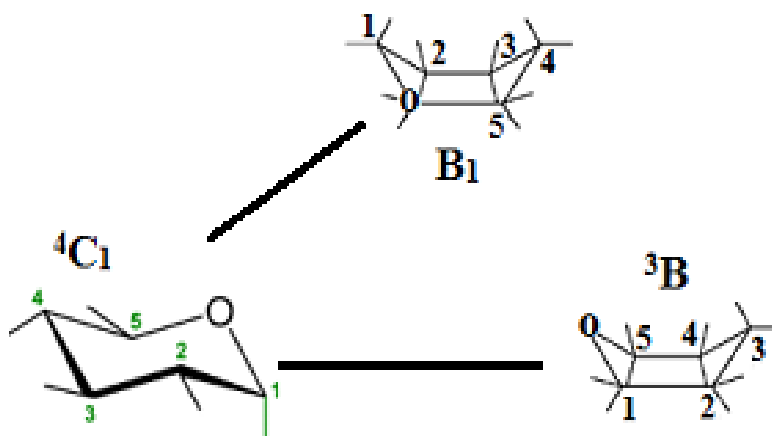
Spektri kristalnih modifikacija dekstrana razlikuju se jedni od drugih, kao i od amorfne modifikacije. IR spektroskopske karakteristike različitih strukturnih modifikacija dekstrana date su u Tabeli 6.

U oblasti 1000-700  $\text{cm}^{-1}$  spektri amornog dekstrana imaju 3 trake srednjeg intenziteta: 912, 844 i 758  $\text{cm}^{-1}$ . Traka u oblasti 825-790 ukazuje na prisustvo u elementarnom prstenu ekvatorijalno-ekvatorijalni (eq-eq) raspored susednih CH grupa. Za eq-eq, aksijalno-ekvatorijalni (ax-eq) i aksijalno-aksijalni (ax-ax) raspored karakteristične su trake u intervalima: 855-825, 885-860 i 925-885, respektivno. U spektru amornog dekstrana nalaze se trake karakteristične za eq-ax i ax-ax raspored CH grupa (844 i 912  $\text{cm}^{-1}$ ), a nema traka u oblasti 885-860 i 825-790  $\text{cm}^{-1}$ , što ukazuje na odsustvo ax-eq i eq-eq rasporeda CH grupa piranoznog prstena. Shodno tome, za elementarni prsten amornog dekstrana šema CH grupa će biti eq-ax-ax-ax-ax (gde redosled zapisa slova u šemi odgovara numeraciji atoma ugljenika u piranoznom prstenu), što odgovara konformaciji  ${}^4C_1$  piranoznog prstena. Spektri različitih kristalnih modifikacija (v. Tab. 6), imaju trake na 910, 838 i 760  $\text{cm}^{-1}$ , tako da se kristalni uzorak dekstrana razlikuje od amornog samo neznatnim pomeranjem maksimuma traka. Shodno tome, i ova modifikacija ima  ${}^4C_1$  konformaciju.

**Tabela 6.** Frekvencije apsorpcionih traka u IR spektrima različitih strukturnih modifikacija dekstrana, sa prostornim rasporedom susednih CH grupa na glukopiranoznoj jedinici

Br. uzorka struk. Modif.	Apsorpcione trake u IR oblasti 1000 – 700 $\text{cm}^{-1}$ (položaj susednih CH grupa)					
	> 925	925-885 (ax-ax)	885-860 (ax-eq)	855-825 (eq-ax)	825-790 (eq-eq)	< 790
1 amor.	-	912	-	844	-	758
2 krist.	-	910	-	838	-	760
3 krist.	948	915, 900	885	855, 844	-	756
4 krist.	945	915, 905	882	844, 835	-	753
5 krist.	948	915	865	847	-	760
6 krist.	945	914	879	852, 843	-	758
7 amor.	-	912	-	850	-	768
8 amor.	-	914	-	845	-	760

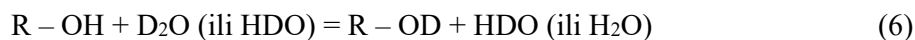
Rezultati spektroskopskih ispitivanja dozvoljavaju pretpostavku da pri kristalizaciji dekstrana u tečnoj sredini, usled izmene pakovanja makromolekula u kristalnoj oblasti polimera, proizilazi promena oblika  ${}^4C_1$  konformacije stolice D-glukopiranoznih prstenova u pravcu B<sub>1</sub> i  ${}^3B$  konformacije lađe (v. Sl. 12). Moguće da polimerni lanci u kristalnoj oblasti polimera sadrže anhidro-D-glukopiranozne prstenove u izvrnutoj konformaciji, dok kod amornih imaju pređašnju  ${}^4C_1$  konformaciju.



**Slika 12.** Promena oblika  ${}^4C_1$  konformacije "stolice" D-glukopiranoznih prstenova u pravcu  $B_1$  i  ${}^3B$  konformacije "lađe" pri kristalizaciji dekstrana u tečnoj sredini usled izmene pakovanja makromolekula u kristalnoj oblasti polimera

*Efekte promene temperature.* Na izgled, oblik i položaj apsorpcione trake u IR spektru, značajno može uticati temperatura na kojoj se snima spektar. Sniženje temperature može da se na nekoliko načina odrazi na izgled spektra. Najčešće se spektri snimaju na temperaturi ključanja tečnog azota (*liquid nitrogen temperature*), a dobijeni spektri se u žargonu nazivaju LNT spektri. Sniženje temperature utiče na bolje razdvajanje traka, a uzrok tome je veća naseljenost osnovnog vibracionog nivoa, što favorizuje fundamentalne prelaze u viši sa vibracionim kvantnim brojem 1, a reducira overtonove koji zbog anharmoničnosti vibracija imaju manju energiju (frekvenciju) od fundamentalnih. Rezultat ovoga je poluširina trake i njihovo bolje razdvajanje istovremeno. Zbog smanjenja dimenzija elementarne ćelije, veze unutar gradivnih jedinki se smanjuju, što je naročito izraženo u slučaju protona vezanog na heteroatome (kiseonik, azot itd.) pa to utiče na frekvenciju odgovarajuće vibracije. Ispitivanje uticaja temperature olakšava empirijsku asignaciju traka.

*Deuteriranje.* Izotopska izmena vodonikovih atoma deuterijumom (jednačina 6) kombinovana sa FTIR spektroskopijom ima značajnu ulogu u određivanju strukture polisaharida i prisustvo molekula vode:



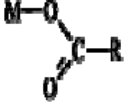
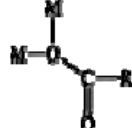
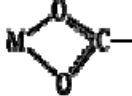
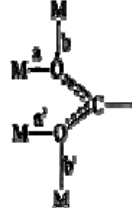
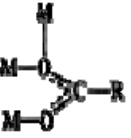
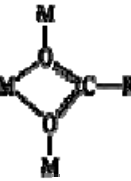
Zapaženo je da kod polisaharida dostupnost deuteriranja za jedan čas iznosi oko 50-60 %. Deuteriranje posle ovog vremena (čak i nekoliko dana) ne utiče znatno na njegovo povećanje. Same strukturne izmene u procesu reakcije moguće je proslediti po apsorpcionim trakama u oblasti  $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ , uslovljenim  $\nu(\text{OH})$  vibracijama. Pri izotopskoj izmeni O-H u O-D grupu, frekvencija valentnih vibracija se snižava za  $\sqrt{2}$  puta i pada u oblast  $2700-2300\text{ cm}^{-1}$ . Ispitivanje reakcijom deuteriranja je osetljiva metoda ocene okruženja OH grupa, što je povezano sa intenzitetom vodonične veze koju obrazuju.

Metodom IR spektroskopije uz primenu deuteriranja uzoraka, može se odrediti i stepen kristaličnosti polisaharida. Kristaličnost predstavlja deo uređene oblasti saharida u kojoj su makromolekuli povezani uporednim vodoničnim vezama. Pri obradi uzoraka sa  $\text{D}_2\text{O}$  obično se OH grupe u manje uređenim ili amorfnim oblastima brzo pretvaraju u OD grupe, dok se izmena OH grupa u kristalnim oblastima odvija veoma sporo. Tako se stepen kristaličnosti određuje na osnovu promena intenziteta trake asim,  $\nu(\text{OH})$  vibracije i pojave nove trake  $\nu(\text{O-D})$  vibracije. Odnosi intenziteta traka na  $1429$  i  $893\text{ cm}^{-1}$ , uzeti su kao empirijski pokazatelji stepena kristaličnosti uzoraka. Sa opadanjem kristaličnosti nestaje traka na oko  $1430\text{ cm}^{-1}$  i dolazi do povećanja intenziteta trake na oko  $900\text{ cm}^{-1}$ , karakteristične za amorfnost. Još bolji odnos zapaža se kod traka na oko  $1370$  i  $2900\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.8.5.1. Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije**

Na osnovu analize IR može se pratiti ishod sinteze, prirodu interakcija metal-ligand analizom oblasti funkcionalnih grupa uključenih u obrazovanje kompleksa, o dentatnosti liganda (monodentatni, bidentatni, mostni), o načinu koordinacije sa jonom biometala, vrsti donorskih atoma, kao i o tipu kompleksa (mononuklearni, binuklearni, polinuklearni). Glavna karakteristika u IR spektrima kompleksa prelaznih metala sa O-donor ligandima tipa kiselina jeste frekvencija simetričnih ( $\nu_s$ ) i asimetričnih ( $\nu_{as}$ )  $-\text{COO}$  vibracija. Frekvencija ovih vibracija zavisi od koordinacije metalnog jona sa karboksilnom grupom iz liganda. Pregled položaja traka, intenziteta, kao i dentatnosti karboksilne grupe u koordinaciji sa metalnim jonima dati su u Tabeli 7 (Dendrinou-Samara i sar., 1998; Agotegaray i sar., 2010; Dimiza i sar., 2010; Tita i sar., 2011).

**Tabela 7.** Karakteristične vibracije karboksilne grupe sa različitom koordinacijom M-L

Tip koordinacije	$\nu_{as}(\text{COO})$	$\nu_s(\text{COO})$	$\Delta\nu = \nu_{as}(\text{COO}) - \nu_s(\text{COO})$
Monodentatni 	1560-1620	1370-1425	150-210
Monodentatni dvostruko vezan 	1580-1620	1370-1410	170-230
Bidentatni 	1520-1570	1410-1450	70-130
Bidentatni dvostruko vezan 	1550-1600	1400-1430	100-160
Bidentatni trostruko vezan a)  b) 	1560-1600	1380-1420	100-130

### 2.8.6. Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS)

AAS je metoda za određivanje koncentracije nekog metala u datoj supstanci merenjem apsorpcije zračenja od strane nepobuđenih atoma u plazmi tog elementa, nastalih iz date

supstance. Određivanje se vrši na talasnoj dužini jedne od apsorpcionih linija, koja je karakteristična za element koji se ispituje (rezonantna linija). Apsorpcija se javlja u optičkoj ili normalnoj spektrohemijskoj oblasti (200-1000 nm). Glavne osobine AAS kao analitičke tehnike, velika specifičnost određivanja i univerzalnost metode, doprinele su širokoj primeni ove tehnike za određivanje sadržaja metala u kompleksnim jedinjenjima, kao i u geohemijskim ispitivanjima. Visoka preciznost, od 0,1 do 1 % od merene vrednosti koncentracije, povezana je u najvećoj meri sa prevođenjem uzorka u rastvor, jer se time znatno smanjuje njegova nehomogenost (Mišović i Ast, 1989). Kod plamene AAS granica detekcije je od nekoliko *ppb* do nekoliko desetina *ppb*, dok su kod besplamene AAS granice 100-1000 puta niže. Metodama AAS mogu se određivati mnogi metali (Fe, Cu, Co, Zn, Ca, Mg i dr.) u biološkim uzorcima ili farmakološkim preparatima (Mišović i Ast, 1989).

### **2.8.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)**

Osnove rada skenirajućeg elektronskog mikroskopa sastoje se od skeniranja površine ispitivanog uzorka fokusiranim snopom elektrona vrlo precizno. Snop elektrona ekscituje elektrone u sastavu atoma uzorka. Energija elektrona iz snopa u proporciji je sa interaktivno ekscitovanim elektronima iz uzorka. Energije ekscitovanih elektrona iz uzorka se sakupljaju i mere specijalnim detektorima. Pomoću mikroprocesora stvara se pseudotrodimenzijska slika topografije površine uzorka. Skenirajući elektronski mikroskop može imati rezoluciju i do nekoliko nanometara, pri čemu može da radi sa uvećanjima 10 000-300 000 puta i kao takav jedan je od najčešće korišćenih uređaja za karakterizaciju nanomaterijala. Elektroni uzorka mogu da emituju i X-zrake povratkom iz ekscitovanog u osnovno stanje. Ova pojava je osnova metode energijske disperzione spektroskopije X-zraka (eng. *Energy-Dispersive X-Rays Spectroscopy*, EDX ili EDS), koja je često moguća u sklopu samog elektronskog mikroskopa. Emitovani X-zraci se analiziraju i daju podatke o hemijskom sastavu površine uzorka na osnovu činjenice da su dobijeni spektri karakteristični za svaki element. U tipičnom SEM eksperimentu generiše se snop primarnih elektrona fokusiran u tačku prečnika oko 5 nm, sa energijama elektrona koje variraju od 100 eV do 50 keV. Deo predate neelastične energije elektronima u materijalu dovodi do ekscitacije elektrona iz elektronskih ljuski atoma. Tako ekscitovani atomi vraćaju se u osnovno stanje, emitujući fotone karakterističnog X-zračenja ili emisijom Augerovih elektrona. Deo elastično rasejanih primarnih elektrona vraća se iz materijala kroz površinu kao odbijeni elektroni sa

verovatnoćom proporcionalnom atomskom broju posmatrane regije materijala. SEM sistem formira sliku detektovanjem svih pomenutih tipova zračenja koji se javljaju kao rezultat interakcije primarnog elektronskog snopa sa materijalom. Detektori sekundarnih elektrona su standardna oprema svih SEM uređaja, a retko su prisutni detektori za sve signale (Mentus i Mioč, 1992; Milosavljević, 1994).

### 2.8.8. Difrakcija X-zračenja (XRD)

Difrakcija X-zračenja je veoma važna metoda ispitivanja kristalne strukture. Kristalna struktura nanočestica srebra određena je metodom širokougaone difrakcije X-zračenja (XRD). Na osnovu dobijenih difrakcionih spektara, identifikacija kristalnih faza, njihovih prostornih grupa simetrije i odgovarajućih parametara elementarne ćelije ostvaruje se poređenjem položaja i intenziteta svih detektovanih difrakcionih maksimuma sa odgovarajućim referentnim JCPDS difraktogramima makroskopskih kristala. Difraktogrami X-zračenja za površinski centriranu kubnu rešetku, kakva se očekuje kod AgNPs, treba da pokažu pikove (maksimume) na  $38^\circ$ ,  $44^\circ$ ,  $64^\circ$ ,  $77^\circ$  i  $81^\circ$ , i oni mogu biti prepoznati kao 111, 200, 220, 311 i 222, respektivno. Snimljeni su pomoću Seifert V-14 uređaja, koristeći  $K\alpha_{1/2}$  dublet linija bakra talasne dužine  $\lambda_x = 0.154$  nm u intervalu Bragg-ovih uglova  $2\theta$  od  $5^\circ$  do  $90^\circ$ . Vreme prikupljanja signala po koraku  $2\theta$  od  $0.02^\circ$  iznosilo je 2s.

Širina difrakcionih maksimuma  $\beta_{hkl}$  na difraktogramima je odličan parametar za procenu reda veličine srednjih dimenzija nanokristalita  $D_{hkl}$ . Scherrer-ova jednačina povezuje veličinu nanokristala i širinu difrakcionih maksimuma preko relacije (7):

$$D_{hkl}(2\theta) = K \cdot \lambda_x / \beta_{hkl} \cdot \cos\theta_{hkl} \quad (7)$$

ovde je  $K \sim 1$ ,  $\lambda_x$  - talasna dužina x-zračenja. Brojevi h, k, i l predstavljaju Milerove indekse kristalne rešetke uočenog maksimuma,  $B$  - širina difrakcionog maksimuma na polovini njegove visine,  $\theta$  - upadni ugao X-zraka.

### 2.8.9. Energijaska disperziona spektroskopija X-zraka (EDX)

EDX je efikasna metoda za određivanje sastava materijala, tj. identifikaciju elemenata u uzorcima, a radi u sklopu skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Ova tehnika koristi X-zrake emitovane iz uzorka za vreme bombardovanja elektronskim snopom. Tokom bombardovanja uzorka elektronskim snopom iz SEM-a pojedini elektroni površinskih atoma bivaju izbačeni. Nastalu vakanciju popunjava elektron sa višeg nivoa, pri čemu emituje X-zrak kao posledicu zakona održanja energije za ova dva elektrona različite energije veze. EDX detektor meri broj emitovanih X-zraka u zavisnosti od energije. S obzirom na to da je energija X-zraka karakteristika elemenata iz koga je X-zrak emitovan, dobijeni spektar energije u zavisnosti od relativnog broja detektovanih X-zraka korišćen je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu elemenata prisutnih u ispitivanom uzorku. Prisustvo elementarnog srebra pokazuju intenzivni signali u spektrogramu na oko 2,8 i 3,15 eV, slabi signali sumpora na 2,31 i 2,46 eV, dok kiseonik daje signal 0,526 eV, a natrijum na oko 1,04 i 1,07 eV.

### 2.8.10. Dijaliza

Dijaliza kao metoda uglavnom se primenjuje za razdvajanje molekularno dispergovanih od koloidnih sistema. Razdvajanje se postiže polupropustljivom membranom, čije su pore tako fine da zadržavaju koloidne i makromolekularne čestice, a propuštaju čestice manjih molarnih masa (Mitić, 2009). Ova tehnika se široko primenjuje u industriji i laboratorijskoj praksi za prečišćavanje i koncentrisanje. U slučaju sinteze AgNPs ovom tehnikom se može ukloniti višak neizreagovanih jona (nitratni, joni srebra i natrijuma), što je važno za spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije. Uklanjanje viška jona srebra iz reakcione smeše je važno i zbog sprečavanja mogućnosti oksidacije drugih organskih molekula. Srebro je uklonjeno dijalizom naspram dejonizovane vode. Rastvori AgNPs-CMD, AgNPs-DS i AgNPs-E su kvantitativno preneseni u creva za dijalizu (Spectra/Por, M.W.C.O. 12000, proizvođača „Spectrum Medical Industries, Inc.”) čiji je cut off 12 kDa.



### **2.8.11. Gel permeaciona hromatografija (GPC-SEC)**

Hromatografska metoda bazirana na različitim veličinama molekula, jedna je od standardnih metoda u frakcionisanju i karakterizaciji polimera. Glavna prednost nad ostalim metodama je u tome što pruža uspešno frakcionisanje za određeni vremenski period. Gel-hromatografsko razdvajanje se vrši u zatvorenom sistemu, pod određenim pritiskom (Marković i sar., 1998). Polimer je rastvoren u pogodnom rastvaraču, a razdvajanje različitih efektivnih veličina makromolekula u rastvoru, predstavlja rezultat funkcija njihove molarne mase, veličina pore pakovanja kolone i afiniteta polimera i rastvarača. Stacionarnu fazu predstavlja matrica gela (poroznog polimera sa porama različitih veličina) ispunjena tečnošću (eluentom) sa slabo izraženim adsorpcionim osobinama, tako da se razdvajanje molekula vrši isključivo prema njihovom obliku i veličini, tj. hidrodinamičkoj zapremini. Mehanizam razdvajanja u GPC-SEC pretpostavlja da je razdvajanje zasnovano na difuzionoj ravnoteži koja uslovljava da je vreme zadržavanja komponenti uzorka direktno proporcionalno dubini penetracije kroz pore gela. Kao rezultat eksperimenta dobija se eluacioni dijagram-hromatogram, koji se pomoću kalibracione krive može prevesti u krivu raspodele molarnih masa, integralnu ili diferencijalnu (Gutnikov i Scott, 2000).

### **2.8.12. Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra**

Antimikrobna aktivnost sintetisanih AgNPs analizirana je primenom disk-difuzione metode kao indirektna kvantitativne metode, koja je zasnovana na posrednom određivanju broja mikroorganizama izraslih na hranljivoj podlozi, odnosno brojanju kolonija koje su u toku inkubacije formirale pojedinačne ćelije mikroorganizama.

Princip ove metode je da ispitivani antimikrobni uzorak difunduje u hranjivu podlogu i deluje inhibitorno na razmnožavanje mikroorganizma (bakterija i gljiva) prethodno zasejanih na tu podlogu. Najčešće primenjivana difuziona metoda je disk metoda (metoda tablete). U tom slučaju koriste se diskovi ili tablete obloženi tačno određenom koncentracijom ispitivanog uzorka. Hranljiva podloga se prethodno zaseje suspenzijom određene gustine čiste kulture ispitivanog soja (inokulum), a potom se stave diskovi ili tablete iz kojih uzorak difunduje u podlogu. Dobijeni rezultat očitava se kao prečnik zone inhibicije rasta mikroba nakon inkubacije od 18-24 časa na 37 °C. Ukoliko su svi uslovi standardizovani (pritisak,

temperatura, pH, vreme inkubacije) onda je prečnik zone inhibicije proporcionalan koncentraciji ispitivanog antimikrobnog uzorka. Naime, ako je zasejan mikroorganizam osetljiv na dejstvo antimikrobnog uzorka, on neće porasti u zoni njegove aktivnosti.

Na širinu zone inhibicije mogu da utiču sledeći faktori:

- osobine podloge,
- veličina inokuluma,
- faza razmnožavanja u kojoj se nalazi ispitivani mikroorganizam,
- stabilnost antimikrobnog sredstva.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. Priprema uzoraka

U disertaciji su korišćeni komercijalni proizvodi: bakar(II)-acetat monohidrat ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich), kobalt(II)-hlorid heksahidrat ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich), karboksimetil dekstran (CMD „Zdravlje”, Leskovac, Srbija), natrijumova so dekstran sulfata (DS) (Sigma Aldrich, Švedska,  $M_w = 500\,000$  g/mol, 17 % S), nadzemni deo dimnjače (*Fumaria herba*) sa područja Srbije (Chamomilla, Banatski Karlovac). Biljni materijal je neposredno pre analize samleven u laboratorijskom električnom mlinu (”BRAUN AROMATIC KSM2”), biljni ekstrakt *Fumaria officinalis* L, dobijen ekstrakcijom u laboratoriji na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu,  $\text{AgNO}_3$  (Merck-Darmstadt, Nemačka), NaOH (Sigma-Aldrich, Švedska). Za pripremanje rastvora korišćena je redestilovana voda. Svi reagensi su analitičke čistoće i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

#### 3.1.1. Sinteza kompleksa bakra sa CMD

U rastvor koji sadrži 2 mmol CMD liganda u 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , je dodavan ukapavanjem rastvor koji sadrži 1 mmol bakar(II)-acetat monohidrat uz konstantno mešanje do pH oko 7 i zagrevanje do ključanja. Promena boje reakcione smeše (od plave do zelene) ukazuje na formiranje kompleksa. Iz reakcione smeše su uzimani uzorci nakon 10, 60 i 90 minuta, snimani njihovi UV spektri i merena apsorbanca. Reakciona smeša je zatim ohlađena do sobne temperature, a kompleks je taložen dodavanjem 50 ml 96 % etanola. Posle stajanja preko noći, etanol je dekantovan, a talog ponovo rastvaran redestilovanom vodom. Dijaliza rastvora korišćena je za uklanjanje nepoželjnih jona. Konačno, kompleks je taložen iz dijalizovanog rastvora 96 % etanolom i nakon odvajanja sušen 3 časa na  $105\text{ }^\circ\text{C}$  u vakuum sušnici.

#### 3.1.2. Sinteza kompleksa bakra sa DS

U rastvor koji sadrži 2 mmol DS liganda u 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , je dodavan ukapavanjem rastvor koji sadrži 1 mmol bakar(II)-acetat monohidrat uz konstantno mešanje (10 i 60 minuta) do pH oko 7. Rastvor se zagreva do ključanja i do promene boje reakcione smeše. Promena boje rastvora od plave do zelene pokazala je da je sinteza kompleksa završena. Reakciona smeša je zatim

ohlađena na sobnoj temperaturi, a kompleks je taložen dodavanjem 50 ml 96 % etanola. Posle stajanja preko noći, etanol je dekantovan, a talog ponovo rastvaran redestilovanom vodom. Dijaliza rastvora korišćena je za uklanjanje nepoželjnih jona. Konačno, kompleks je taložen iz dijalizovanog rastvora 96 % etanolom i nakon odvajanja osušen 3 časa na 105 °C u vakuumskoj sušnici.

### **3.1.3. Sinteza kompleksa kobalta sa CMD**

U rastvor koji sadrži 2 mmol CMD liganda u 100 ml H<sub>2</sub>O, je dodavan ukapavanjem rastvor koji sadrži 1 mmol kobalt(II)-hlorid heksahidrat uz konstantno mešanje (10 i 60 minuta) do pH oko 7. Rastvor se zagreva do ključanja i do promene boje reakcione smeše. Promena boje rastvora iz slabo ružičaste u roze boju pokazala je da je sinteza kompleksa završena. Reakciona smeša je zatim ohlađena na sobnoj temperaturi, a kompleks je taložen dodavanjem 50 ml 96 % etanola. Posle stajanja preko noći, etanol je dekantovan, a talog ponovo rastvaran redestilovanom vodom. Dijaliza rastvora korišćena je za uklanjanje nepoželjnih jona. Konačno, kompleks je taložen iz dijalizovanog rastvora 96 % etanolom i nakon odvajanja osušen 3 časa na 105 °C u vakuumskoj sušnici.

### **3.1.4. Sinteza kompleksa kobalta sa DS**

U rastvor koji sadrži 2 mmol DS liganda u 100 ml H<sub>2</sub>O, je dodavan ukapavanjem rastvor koji sadrži 1 mmol kobalt(II)-hlorid heksahidrat uz konstantno mešanje (10 i 60 minuta) do pH oko 7. Rastvor se zagreva do ključanja i do promene boje reakcione smeše. Promena boje rastvora iz slabo ružičaste u roze boju pokazala je da je sinteza kompleksa završena. Reakciona smeša je zatim ohlađena na sobnoj temperaturi, a kompleks je taložen dodavanjem 50 ml 96 % etanola. Posle stajanja preko noći, etanol je dekantovan, a talog ponovo rastvaran redestilovanom vodom. Dijaliza rastvora korišćena je za uklanjanje nepoželjnih jona. Konačno, kompleks je taložen iz dijalizovanog rastvora 96 % etanolom i nakon odvajanja osušen 3 časa na 105 °C u vakuumskoj sušnici.

### 3.1.5. Sinteza nanočestice srebra sa CMD

U reaktor zapremine 100 ml, pri sobnoj temperaturi, najpre je dodato 20 ml sveže pripremljenog CMD (0,002 M), a nakon 10 minuta, uz konstantno mešanje (300 obr/min), i 10 ml rastvora AgNO<sub>3</sub> (0,001 M). Suspenzija je podvrgnuta mešanju tokom 2 časa, a potom je podešena pH vrednost suspenzije na 7, dodavanjem 0,4 ml rastvora NaOH (0,001M). Smeša je držana 24 časa pod refluksom. Promena bele u žutu boju reakcione smeše ukazuje na formiranje AgNPs-CMD nanočestica. Reakciona smeša je zatim ohlađena do sobne temperature, a nanočestice AgNPs-CMD su taložene 96 % etanolom. Posle stajanja preko noći, etanol je dekantovan, a talog ponovo rastvaran redestilovanom vodom. Konačno, nanočestice su istaložene iz rastvora 96 % etanolom i nakon dekantovanja alkohola sušene 3 časa na 105 °C u vakuum sušnici.

### 3.1.6. Sinteza nanočestice srebra sa DS

U reaktor zapremine 100 ml, pri sobnoj temperaturi, najpre je dodato 20 ml sveže pripremljenog DS (0,002 M), a nakon 10 minuta, uz konstantno mešanje (300 obr/min) i 10 ml rastvora AgNO<sub>3</sub> (0,001 M). Suspenzija je podvrgnuta mešanju tokom 2 časa, a potom je podešena pH vrednost suspenzije na 7 dodavanjem 0,4 ml rastvora NaOH (0,001 M). Smeša je držana 24 časa pod refluksom. Promena bele u žutu boju reakcione smeše ukazuje na formiranje AgNPs-DS nanočestica. Reakciona smeša je zatim ohlađena do sobne temperature, a nanočestice AgNPs-DS su taložene 96 % etanolom. Posle stajanja preko noći, etanol je dekantovan, a talog ponovo rastvaran redestilovanom vodom. Konačno, nanočestice su istaložene iz rastvora 96 % etanolom i nakon dekantovanja alkohola sušene 3 časa na 105°C u vakuum sušnici.

### 3.1.7. Sinteza nanočestice srebra sa ekstraktom *Fumaria officinalis* L

Vodeni rastvor koji sadrži *Fumaria officinalis* L, kao redukujući i zaštitni agens (0,50 g osušenog ekstrakta u 50 ml redestilovane vode), je dodavan ukapavanjem u rastvor koji sadrži AgNO<sub>3</sub> (50 ml, 0.001 M) u reaktoru uz konstantno mešanje. Sinteza je vršena tokom 2 časa na dva načina: na temperaturi ključanja ili na sobnoj temperaturi. Iz reakcionih smeša

uzimani su uzorci u različitim vremenskim intervalima (5-120 minuta), kao i nakon stajanja (15 dana-3 meseca), za snimanje UV-Vis spektara. Promena boje reakcione smeše (bezbojne do žute) ukazuje na formiranje AgNPs-E nanočestica. Za snimanje FTIR spektara ohlađena reakciona smeša je prethodno podvrgnuta dijalizi, a potom sušena pod vakuumom.

## **3.2. Metode ispitivanja**

### **3.2.1. UV-Vis spektrofotometrija**

Apsorpcioni spektri kompleksa bakra, kobalta i nanočestice srebra sa polisaharidima karboksimetil dekstranom, dekstran sulfatom i ekstraktom snimani su na spektrofotometru Varian Cary-100 Conc. UV-Vis u talasnoj oblasti od 190-900 nm. Snimanje uzoraka je vršeno u kvarenim kivetama (1x1 cm) na sobnoj temperaturi, u odnosu na redestilovanu vodu. Kompjuterska obrada snimljenih UV-Vis spektara vršena je softverskom aplikacijom Carz. UV-Conc (Copyright©, Varian 1999) pod Windows XP OS podrškom.

#### **3.2.1.1. Jobb-ova metoda bioelementa Cu**

Za određivanje odnosa metala i liganda kompleksa Cu-CMD, prema Jobb-ovoj metodi pripremani su rastvor bakar acetata 0,0995 g rastvoren u 50 ml vode i osnovni rastvor CMD 0,119 g u 50 ml vode. Od ovih rastvora pripremljena je serija rastvora dobijena mešanjem osnovnih rastvora u različitom molskom odnosu, a merenje apsorbancije vršeno je na 279 i 744 nm.

#### **3.2.1.2. Metoda molskog odnosa bioelementa Cu**

Pošto su preliminarna ispitivanja pokazala da je kompleks Cu-DS nestabilan, za određivanje odnosa metala i DS, primenjena je metoda molskog odnosa. Pripremani su rastvor bakar acetata 0,050 g rastvoren u 100 ml vode i osnovni rastvor DS 0,110 g u 100 ml vode. Merenje apsorbancije rastvora u različitim molskim odnosima, dobijenih tako što je istoj zapremini rastvora bakra dodavana različita zapremina rastvora DS vršeno je na 215, 254 i 698 nm.

### 3.2.1.3. Jobb-ova metoda bioelementa Co

Za određivanje odnosa metala i liganda kompleksa Co-CMD, prema Jobb-ovoj metodi pripremani su rastvor kobalt hlorida 0,0995 g rastvoren u 50 ml vode i osnovni rastvor CMD 0,119 g u 50 ml vode. Od ovih rastvora je pripremljena serija rastvora dobijena mešanjem osnovnih rastvora u različitom molskom odnosu, a merenje apsorbancije vršeno je na 250 i 510 nm.

### 3.2.1.4. Metoda molskog odnosa bioelementa Co

Pošto su preliminarna ispitivanja pokazala da je kompleks Co-DS nestabilan za određivanje odnosa metala i DS primenjena je metoda molskog odnosa. Pripremani su rastvor kobalt hlorida 0,050 g rastvoren u 100 ml vode i osnovni rastvor DS 0,110 g u 100 ml vode. Merenje apsorbancije rastvora u različitim molskim odnosima dobijenih tako što je istoj zapremini rastvora kobalta dodavana različita zapremina rastvora DS, vršeno je na 254 i 500 nm.

## 3.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Infracrveni spektri Cu, Co i nanočestica srebra sa polisaharidima karboksimetil dekstranom, dekstran sulfatom i ekstraktom dobijeni su metodom presovanja supstance zajedno sa KBr-om. IR spektri čvrstih uzoraka snimani su neposredno posle pripremanja pastile na sobnoj (298 K) i temperaturi tečnog azota (77 K) na FTIR spektrometru BOMEM MB-100 (Hartmann & Braun, Canada), koji je opremljen standardnim (deuterated triglycine sulfat/KBr) DTGS/KBr detektorom, u oblasti talasnih brojeva mid-IR od 4.000-400  $\text{cm}^{-1}$  i pri rezoluciji 2  $\text{cm}^{-1}$ , sa referentnom pastilom pripremljenom od čistog KBr-a (150 mg, Merck). Pre snimanja kroz spektrometar je prodivavan inertni gas azot, zbog eliminisanja vlage i  $\text{CO}_2$ , koji negativno utiču na kvalitet IR spektra. Za snimanje FTIR spektara na temperaturi ključanja tečnog azota "LNT-FTIR spektri" korišćena je ćelija Graseby Specac P/N 21525 sa promenljivom temperaturom. Kompjuterska obrada snimljenih IR spektara vršena je softverskom aplikacijom Win-Bomem Easy™ 3.01C Level II (Copyright© 1991-1994, Galactic Industries Corporation) pod Windows XP OS podrškom.



*Deuteriranje.* Parcijalno deuterirani analozi hidrata kompleksa dobijeni su na tzv. hidrotermalni način, tj. stajanjem 10 mg odgovarajućeg jedinjenja u D<sub>2</sub>O u zatopljenim staklenim ampulama na povišenoj temperaturi (oko 50 °C) u toku dva meseca. Nakon toga su izdvajani filtriranjem, osušeni pod vakuumom, posle čega su snimani njihovi FTIR spektri metodom presovanih tableta u KBr.

### 3.2.3. Atomska apsorpciona spektrometrija (AAS)

Određivanje sadržaja bakra i kobalta je rađeno primenom metoda AAS na AAS spektrometru Philips PYE UNICAM SP 9 u Zavodu za javno zdravlje Leskovac. Merenje je vršeno na 324,8 nm, širina proreza 0,5 nm u plamenu acetilen-vazduh sa Cu lampom kao šupljom katodom.

*Priprema osnovnog standardnog rastvora bakra:* na analitičkoj vagi odmeren je tačno 1 g bakra i rastvaran u 50 ml rastvora HNO<sub>3</sub> koncentracije 5 mol/dm<sup>3</sup>. Rastvor je razblažen vodom R (Aqua redestillata-“Zdravlje” Leskovac), a sadržaj bakra u osnovnom standardnom rastvoru je 1 mgcm<sup>-3</sup>. Od osnovnog standardnog rastvora bakra, razblaživanjem su pripremljeni standardni rastvori. Razblaženi standardni rastvor bakra sadrži: 3,20; 6,40; 9,60; 12,80; 16,00 i 19,20 mg Cu(II)/dm<sup>3</sup> (ppm). Svi reagensi koji su korišćeni za pripremu ispitivanog rastvora dodavani su standardnim rastvorima i rastvoru slepe probe u istim koncentracijama. Kao slepa proba korišćen je rastvor HCl koncentracije 0,5 mol/dm<sup>3</sup>. Na osnovu srednjih vrednosti očitavanja dobijenih sa standardnim rastvorima, konstruiše se kalibraciona prava.

*Ispitivani rastvor:* odmereno je 0,030 g kompleksa Cu sa CMD i rastvoreno u odmernom sudu sa vodom do 25 ml, a za merenje je uziman 1 ml. Merenje je vršeno za obe probe na 324,8 nm, u plamenu acetilen-vazduh sa Cu lampom kao šupljom katodom.

*Priprema osnovnog standardnog rastvora kobalta:* na analitičkoj vagi odmeriti tačno 1 g metala kobalta i rastvoriti u 50 ml HCl (5 mol/dm<sup>3</sup>). Rastvor prebaciti u normalni sud od 1000 ml, razblažiti vodom R, dopuniti do crte i promućkati. Sadržaj kobalta u osnovnom rastvoru je 1 mgcm<sup>-3</sup>. Od osnovnog rastvora otpipetirati 4 ml u normalni sud od 100 ml, zatim rastvorom HCl koncentracije 0,5 mol/dm<sup>3</sup> dopuniti do crte i dobro promućkati. Od ovog razblaženog rastvora otpipetirati po: 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; i 2,0 ml u odmerne sudove od 25 ml, dopuniti rastvorom HCl koncentracije 0,5 mol/dm<sup>3</sup> do crte i promućkati. Svi reagensi koji se

koriste za pripremu ispitivanog rastvora dodaju se standardnim rastvorima i rastvorima slepe probe u istim koncentracijama. Na osnovu srednjih vrednosti očitavanja dobijenih sa standardnim rastvorima, konstruiše se kalibraciona prava. Razblaženi standardni rastvori sadrže: 0,48; 0,80; 1,60; 2,40 i 3 20 mg Co(II)-jona po  $\text{dm}^3$  (*ppm*). Slepa proba je rastvor 0,5 mol/ $\text{dm}^3$  HCl.

*Ispitivani rastvor*: odmereno je 0,020 g uzorka kompleksa Co sa CMD i odmerni sud od 25 ml je dopunjen vodom do crte, a za merenje je uziman 1 ml. Merenje je vršeno na 240,7 nm u plamenu acetilen-vazduh sa Co lampom kao šupljom katodom.

### 3.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija je korišćena kao metoda za ispitivanje morfologije površine nanočestice srebra. Uređaj kojima su vršena merenja je JEOL JSM 6460LV. Uzorci u vidu praha su, pre analize, prekriveni tankim slojevima zlata zbog male električne provodnosti materijala, pomoću uređaja za napanje JPC JEOL-1100, strujom od 30 mA sa udaljenosti od 50 mm tokom 180 s. Uređaj je dodatno opremljenim INCA EDX dodatkom pomoću kojeg je određen sastav uzorka i njegova homogenost po površini.

### 3.2.5. Difrakcija X-zračenja (XRD)

Metoda XRD je korišćena za određivanje i potvrđivanje kristalne strukture nanočestice srebra. Uzorak za XRD analizu je pripremljen nanošenjem centrifugiranog uzorka na mikroskopsku staklenu pločicu i preko noći sušen na vazduhu. Difraktogram je snimljen iz Rigaku MiniFlex 600 difraktometra u opsegu  $2\theta$  od 5 - 70 ° pomoću  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1.540593 \text{ \AA}$ ) kao X-zraka. Kristalna struktura nanočestica srebra određena je metodom širokougaone difrakcije X-zračenja (XRD). Na osnovu dobijenih difrakcionih spektara, identifikacija kristalnih faza, njihovih prostornih grupa simetrije i odgovarajućih parametara elementarne ćelije, ostvarena je poređenjem položaja i intenziteta svih detektovanih difrakcionih maksimuma sa odgovarajućim referentnim difraktogramima makroskopskih kristala.

### 3.2.6. Energijska disperziona spektroskopija X-zraka (EDX)

Za EDX spektralnu analizu nanočestice srebra korišćen je LINK Analytical 2000 QX montiran na JEOL JSM 5300 skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Isti uzorci pripremljeni za SEM analizu, korišćeni su za dobijanje EDX spektra.

### 3.2.7. Dijaliza

Dijaliza je rađena u laboratorijskoj čaši zaštićenoj od svetlosti, na magnetnoj mešalici, uz česte izmene redestilovane vode. Na svaka 24 časa proveravana je uspešnost dijalize, utvrđivanjem prisustva višak srebra u vodi naspram koje je rađena dijaliza. Uzorci od 100 ml AgNPs-CMD, AgNPs-DS i AgNPs-E stavljeni su u creva za dijalizu. Uspešnost dijalize praćena je dodavanjem male količine natrijum hlorida do pojave belog zamućenja u laboratorijskoj čaši koji označava pozitivnu reakciju na prisustvo višak neizreagovanih jona srebra. Izmene vode naspram koje su vršene dijalize uzoraka AgNPs-CMD, AgNPs-DS i AgNPs-E ponavljane su sve do negativnih reakcija na prisustvo jona srebra.

### 3.2.8. Metoda ekstrakcije

U ovom istraživanju kao biljni materijal je korišćen vazdušni deo zemljišnog dima (*Fumaria herba*). Usitnjeni i homogenizovani biljni materijal (5 g) je preliven ključalom vodom (100 ml) i izvršena je ekstrakcija ukupnih ekstraktivnih materija (UEM) u toku 90 minuta na sobnoj temperaturi (solvomodul 1:20 m/v). Nakon ekstrakcije biljni materijal je odvojen od tečnog ekstrakta filtriranjem na Bihnerovom levku, zatim je rastvarač uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču na 60 °C do konstantne mase i čuvan u frižideru na +4 °C do analize. Prinos UEM (suvi ekstrakt) određen je sušenjem tečnog ekstrakta (aliquotni deo, 2 ml) u sušnici na 105 °C do konstantne mase. Koncentracija tečnog ekstrakta (mg/ml) izračunata je na osnovu sadržaja suvog ostatka. Na osnovu dobijenih rezultata izračunat je prinos UEM i izražen u g/100 g biljnog materijala (g/100 g b.m.) korišćenog za ekstrakciju.

### 3.2.9. Gel permeaciona hromatografija (GPC-SEC)

Gel-hromatografska analiza uzoraka vršena je na hromatografskom sistemu HP Agilent GPC-300 sa DAD i RID detektorom, na Zorbax Eclipse PSM-300 koloni. Eluiranje frakcija je vršeno destilovanom vodom na sobnoj temperaturi. Protok u sistemu ( $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ) je održavan konstantnom binarnom pumpom (HP, Agilent). U sistem je dozirano po 20  $\mu\text{l}$  ispitivanog rastvora. UV spektri prisutnih frakcija su snimani DAD detektorom u intervalu talasnih dužina od 200 do 400 nm. Kompjuterska obrada snimljenih HP-GPC hromatograma i UV spektara vršena je softverskom aplikacijom Agilent Chem. Station™ LC 3D Systems (Copyright© 2006, Agilent), pod Windows XP OS podrškom, za automatsku obradu parametara  $M_w$ ,  $M_n$ ,  $M_z$ ,  $M_v$ ,  $D$ ,  $[\eta]$ ,  $V_p$ ,  $M_p$  i A.

### 3.2.10. Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra

Za ispitivanje su korišćeni standardni inokulumi mikroorganizama, koji su pripremani zasejavanjem odgovarajuće kulture mikroorganizma (100  $\mu\text{l}$ ) na tečnoj TSB podlozi (3 ml). Nakon inkubacije inokuluma na 37 °C tokom noći, mikroorganizmi su uzeti iz njihove eksponencijalne faze rasta (16-18 časa od zasejavanja) i kao takvi dalje korišćeni u eksperimentu.

Sama metoda zasniva se na tome da se u sterilne erlenmajere u sterilnoj atmosferi plamenika dodaju sledećim redom: fiziološki rastvor (50 ml), inokulum odgovarajućeg mikroorganizma (500  $\mu\text{l}$ ) i ispitivane nanočestice srebra i kompleksa Cu (1 mg). Kako bi se održala sterilna sredina, erlenmajeri su zatvoreni čepom i držani na temperaturi od 37 °C u vodenom kupatilu tokom 2 časa, uz mešanje. Nakon toga, iz svakog erlenmajera je uzet alikvot suspenzije od 1 ml koji je dalje decimalno razblaživan fiziološkim rastvorom 0,9 % NaCl (sterilizacija u trajanju od 20 minuta na 121°C). Nakon homogenizacije suspenzije na vorteksu gustina suspenzije je podešena poređenjem sa 0,5 McFarlandovim standardom koji odgovara broju mikroorganizama od  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml (eng. *Colony Forming Units*) (Andrews, 2005). Alikvot od 0,1 ml iz odgovarajućeg razblaženja je prebačen u sterilne Petrijeve šolje, nakon čega je prelivan rastopljenom TSA podlogom (~ 20 ml), uz mešanje. Na površinu zasejane podloge postavljeni su sterilni diskovi prečnika 9 mm i impregnirani sa 60  $\mu\text{l}$  rastvora kompleksa Cu i nanočestice AgNPs-CMD, AgNPs-DS i AgNPs-E u koncentracijama 0,25

mgcm<sup>-3</sup>, 0,5 mgcm<sup>-3</sup>, 1 mgcm<sup>-3</sup>. Petrijeve šolje su inkubirane u termostatu na temperaturi od 37 °C tokom narednih 24 časa (Hamblin i Jori, 2011). Nakon inkubacije izmeren je prečnik zone inhibicije rasta mikroorganizama.

Za antimikrobnu aktivnost nanočestica srebra kao indikator sojeva korišćeni su sledeći mikroorganizmi:

**Gram-pozitivne bakterije:**

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- ✓ *Bacillus cereus* ATCC 11778,
- ✓ *Bacillus luteus in haus strain*,
- ✓ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313,

**Gram-negativnih bakterije:**

- ✓ *Escherichia coli* ATTC 25922,
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853,
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* ATTC 700603,
- ✓ *Proteus vulgaris* ATTC 8427, i

**Gljiva:**

- ✓ *Candida albicans* ATTC 2091.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1. Fizičko-hemijske karakteristike kompleksa biometala Cu sa CMD i DS

### 4.1.1. Određivanje stehiometrije kompleksa

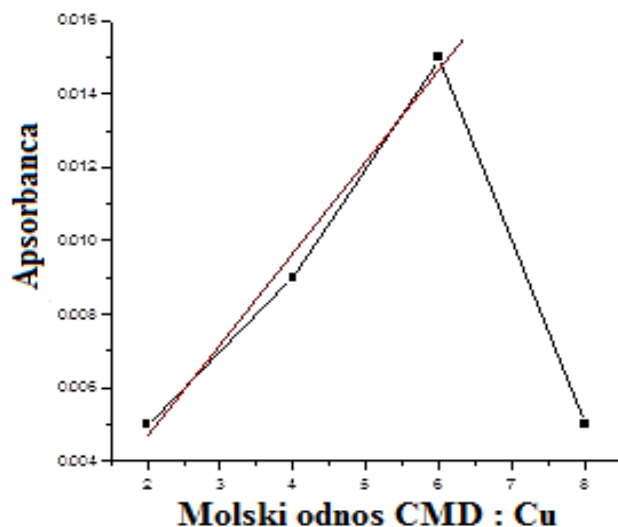
Radi karakterizacije sintetisanih kompleksa ispitivane su neke fizičko-hemijske karakteristike kompleksa, a rezultati su prikazani u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Fizičko-hemijske karakteristike kompleksa Cu

Kompleks	Sadržaj Cu (%)		Prinos (%)	Molski odnos M:L	$\lambda_{\max}$ / nm	Boja kompleksa
	10 min.	60 min.				
<b>Cu-CMD</b>	6,1	12,1	64,06	1:2	279, 309, 744	zelena
<b>Cu-DS</b>	2,5	12,5	25,06	1:1	254, 698	zelena

Rezultati prikazani u Tabeli 8 odnose se na komplekse dobijene na temperaturi ključanja i pH oko 7. Sadržaj bakra u ovim reakcionim uslovima ispitivan je posle 10, odnosno 60 minuta primenom metoda AAS (na osnovu preliminarnih rezultata zaključeno je da se reakcija završava posle 60 minuta). Kao što se vidi, posle 60 minuta ostvaren je prinos jedinjenja Cu-CMD 64 % odnosno Cu-DS oko 25 %, sa sadržajem bakra od 12,1 % odnosno 12,5 % respektivno. Preračunati odnos Cu : ligand bi bio približno 1:2 kod kompleksa Cu-CMD, a kod jedinjenja Cu-DS 1:1. Potvrdu ovakvih molskih odnosa dala su ispitivanja primenom Jobb-ove metode za kompleks Cu-CMD, a za jedinjenje Cu-DS ispitivanja metodom molskog odnosa koja su detaljnije opisana u teoretskom delu rada, pošto su preliminarna ispitivanja pokazala da se Jobb-ova metoda kod ovog jedinjenja ne može primeniti.

Merenje apsorbancije serije standardnih rastvora vršeno je na 744 nm u slučaju kompleksa Cu-CMD, (na ovoj talasnoj dužini postoji apsorpcioni maksimum, v. Sl. 15), a rezultati su prikazani na Slici 13.

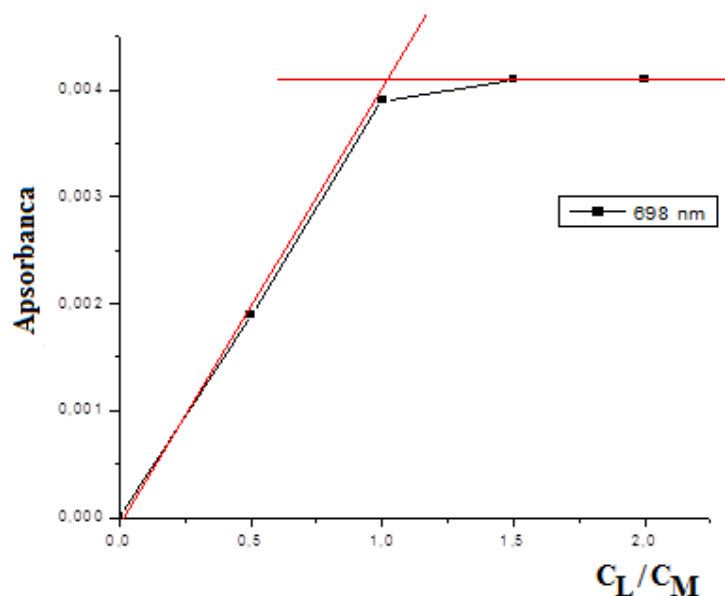


**Slika 13.** Primena Jobb-ove metode za određivanje odnosa M:L (na apscisi su prikazane zapremine rastvora liganda, a zapremine rastvora metala su dopuna do 10 ml).

Kao što može da se vidi sa slike, najveća absorbanca je dobijena kod zapreminskog odnosa ligand : metal  $\sim 6,3:3,7$ , što bi približno odgovaralo odnosu M : L  $\sim 1:2$ . Kod ovakvog odnosa M : L, dva koordinaciona mesta metala mogu biti dopunjena do koordinacionog broja 6, tako da se može formirati kompleks oktaedarske strukture, na šta ukazuje zelena boja kompleksa, ali i položaj apsorpcionog maksimuma. U tom slučaju koordinaciona sfera metala mogla bi da bude dopunjena, najverovatnije, molekulima vode do  $O_h$  tipa kompleksa navedenog metala.

Pošto su preliminarna ispitivanja pokazala da je kompleks Cu-DS nestabilan za određivanje odnosa metala i DS, primenjena je metoda molskog odnosa. Merenje apsorpcije rastvora u različitim molskim odnosima, dobijenih tako što je istoj zapremini rastvora bakra dodavana različita zapremina rastvora DS iste koncentracije, vršeno je na 698 nm, na kojoj kompleks pokazuje najveću vrednost apsorpcije. Rezultati merenja su prikazani na Slici 14. U ovom slučaju tačka preloma koja određuje molski odnos, kako je u teoretskom delu opisano, je za odnos metal : ligand  $\sim 1:1$ , pa bi po pitanju koordinacione sfere bakra i u ovom slučaju važilo da ona može biti dopunjena do  $O_h$  tipa, najverovatnije, molekulima vode.



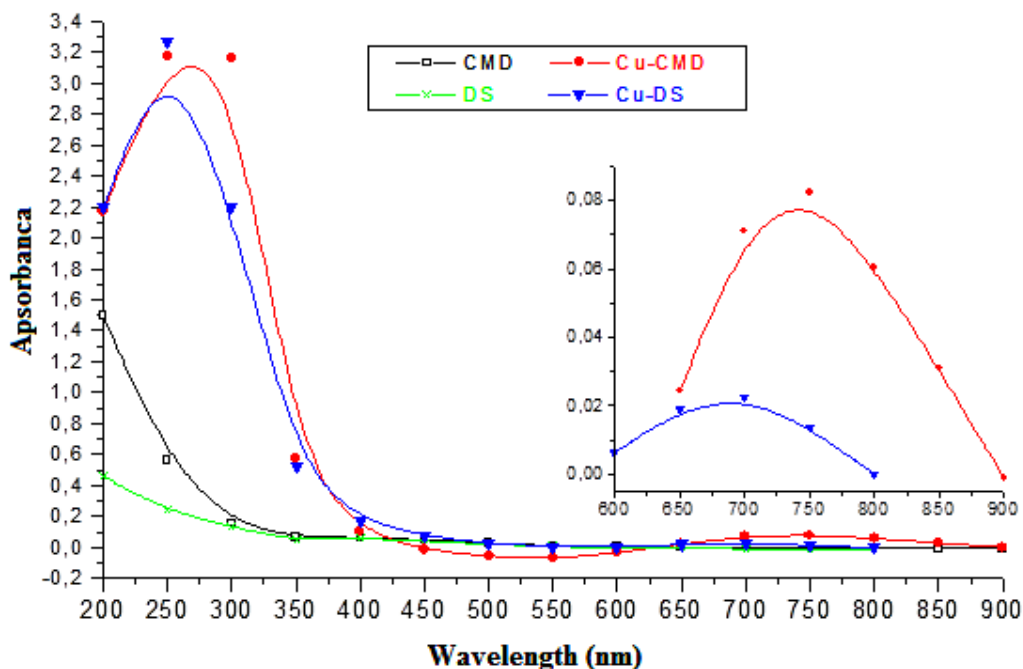


Slika 14. Primena metode molskog odnosa M:L kompleksa Cu-DS.

#### 4.1.2. Spektar strukturne korelacije primenom metode UV-Vis spektrofotometrije

Spektri u UV-Vis oblasti su prikazani na Slici 15. Uvođenjem karboksimetil grupe, odnosno sulfo grupe kao hromofornih grupa u strukturu dekstrana, koji ne pokazuje apsorpciju u bliskoj UV oblasti, nastaju CMD i DS, pa bi se u njihovim UV-Vis spektrima očekivale apsorpcione trake od  $\pi \rightarrow \pi^*$  prelaza, koji je zabranjen po kvantnomehničkim selekcionim pravilima (na oko 180 nm) i  $n \rightarrow \pi^*$  (na oko 270-290 nm) (Nikolić, 2001). Ove trake se najverovatnije zbog slabog intenziteta ne mogu uočiti, ili je njihov položaj izvan granica snimljenog spektra. Međutim, kod kompleksa Cu-DS u oblasti od 200-300 nm postoji intenzivna traka na oko 254 nm, a kod Cu-CMD na 279 nm sa prevojem na 309 nm koje se mogu pripisati  $n \rightarrow \pi^*$  prelazima karboksilne, odnosno sulfo hromoforne grupe. U odnosu na polazne ligande kod kompleksa pokazuju batohromni i hiperhromni efekat, koji je verovatno rezultat promenjene elektronske gustine i povećane verovatnoće prelaza zbog interakcija ligand-metal, odnosno formiranja koordinativne veze. Pojava ovih traka u UV oblasti spektra može da služi kao kriterijum uspešnosti sinteze. Činjenica da je apsorpcioni maksimum kod

jedinjenja Cu-DS na manjim talasnim dužinama ukazuje na jaču vezu, odnosno interakcije Cu-O nego li kod Cu-CMD.



**Slika 15.** UV-Vis spektri CMD, DS i njihovih kompleksa sa biometalom Cu

Pored traka koje se javljaju u UV oblasti, u vidljivoj oblasti spektara postoji široka traka kod Cu-CMD na  $\lambda_{\max} = 744$  nm, a kod Cu-DS na 698 nm. Ove trake, prema položaju i intenzitetu mogu se pripisati prelazima  $d \rightarrow d$  tipa u centralnom metalnom jonu bakra konfiguracije  $\text{Cu}^{2+}:[\text{Ar}] 3d^9$ . Prema kvantnomehničkim pravilima izbora  $d \rightarrow d$  prelaz je zabranjen, a činjenice pokazuju da on stvarno postoji. Do delimičnog odstupanja od zabrane dolazi kombinovanjem talasnih funkcija  $d$ - i  $p$ - orbitala, u slučajevima kada molekul kao celina nema centar simetrije, a njihova simetrija se narušava uvođenjem talasnih funkcija koje se odnose na vibracije liganda.

Ako pretpostavimo da, verovatno, dolazi do interakcije  $d$ - orbitala M(II)-jona sa  $p$ -orbitalama liganda, onda je  $d \rightarrow d$  prelaz ustvari  $p \rightarrow d$  prelaz, koji je dozvoljen po kvantnomehničkim pravilima izbora. Prema literaturnim podacima, što je veće mešanje odgovarajućih  $d$ - i  $p$ - atomskih orbitala ( $p\pi$ - $d\pi$  interakcija), to je i intenzitet odgovarajuće apsorpcione trake veći (Drago, 1981; Lever, 1987).

Na osnovu vrednosti  $\lambda_{\max}$  mogu se izračunati vrednost molarnog energetskog sadržaja za navedene apsorpcione maksimume,  $E_{\max}$  prema relaciji (8):

$$E_m = h \cdot \nu \cdot N_A = h \cdot c \cdot N_A / \lambda \quad (8)$$

U ovoj jednačini je:  $h$  - Planck-ova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js),  $\nu$  - frekvencija ( $s^{-1}$ ),  $c$  - brzina svetlosti ( $3 \cdot 10^{10}$   $cm s^{-1}$ ),  $N_A$  - Avogadrov broj ( $6,02 \cdot 10^{23}$   $mol^{-1}$ ),  $\lambda$  - talasna dužina (cm).

Posle uvođenja brojnih vrednosti i preračunavanjem, vrednosti molarnog energetskog sadržaja bi iznosile:  $6,62 \cdot 10^{-34}$  Js  $\cdot 3 \cdot 10^{17}$   $nm \cdot s^{-1} \cdot 6,02 \cdot 10^{23}$   $mol^{-1} / \lambda = 1,197 \cdot 10^5 / \lambda$  (nm) =  $160,89$   $kJ \cdot mol^{-1}$  za jedinjenje Cu-CMD, odnosno  $171,49$   $kJ \cdot mol^{-1}$  za jedinjenje Cu-DS što odgovara energiji vidljive oblasti spektra za zabranjeni  $d \rightarrow d$  prelaz.

Izračunate, energije cepanja kristalnim poljem prema relaciji  $\Delta = \nu \cdot 1,2938 \cdot 10^{-4} = 1,2938 \cdot 10^{-4} / \lambda$  bi iznosile  $1,74$  (eV) za jedinjenje Cu-CMD, odnosno  $1,83$  (eV) za jedinjenje Cu-DS. Ovakve vrednosti ukazuju na tetragonalno deformisane komplekse oktaedarske koordinacije.

### 4.1.3. Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije

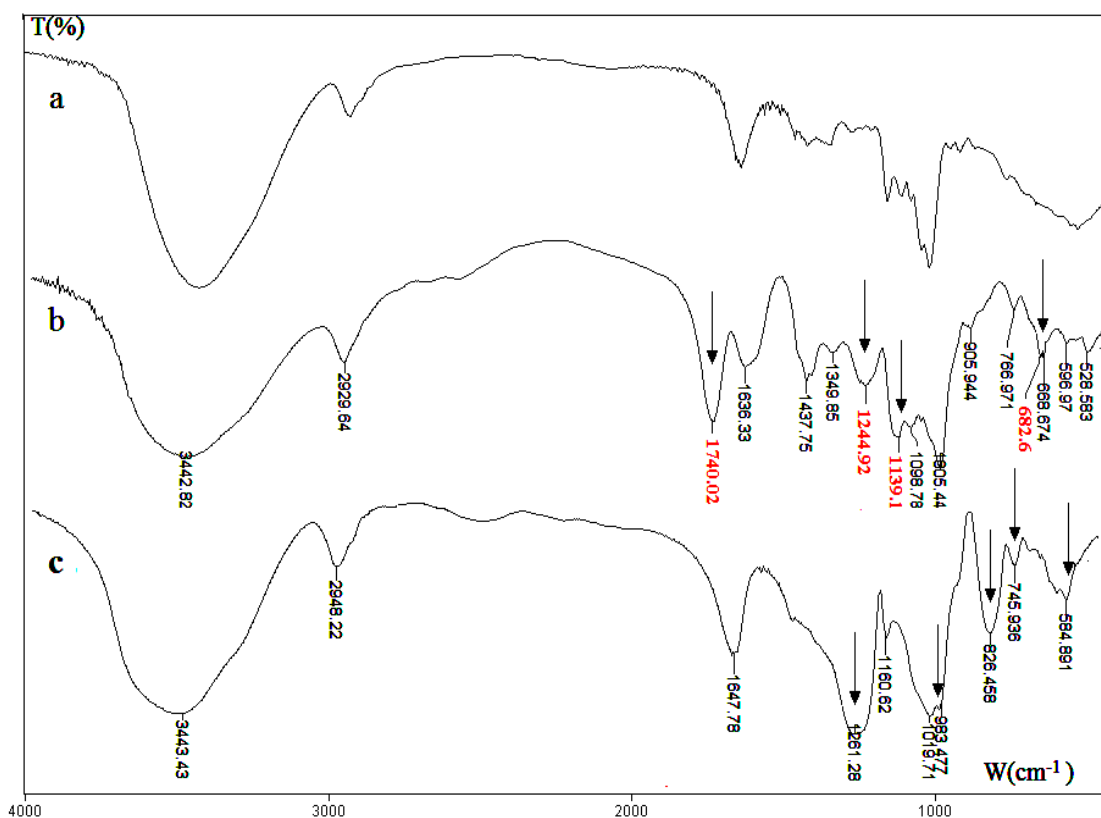
Analiza infracrvenih spektara sintetisanih jedinjenja vršena je na empirijski način tj. na osnovu literaturnih podataka, međusobnim upoređivanjem spektara polaznih jedinjenja dekstrana, karboksimetil dekstrana i kompleksa, ali i korišćenjem specijalnih metoda analize spektara (metoda izotopske izmene i snimanje spektara na temperaturi ključanja tečnog azota, tzv. LNT spektri).

Infracrveni spektar dekstrana je bio predmet mnogobrojnih ispitivanja (Cakić i sar., 2008; Nikolić i sar., 2009; Mitić i sar., 2009; Nikolić i sar., 2008; Mitić i sar., 2007; Mitić, 2008; Vasko i sar., 1971; Barker i sar., 1953). Izučavanjem spektralnih oblasti dekstrana mogu da se dobiju različiti podaci: o sadržaju  $\alpha$ -1,6 veza, (ali i drugih veza  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4) što je važna informacija o linearnosti, odnosno o stepenu grananja polimera, o stepenu kristaličnosti, konformaciji glukopiranoznih jedinica (koja kao što je poznato ima 6 forme), o konformacionim prelazima, kako je opširnije prikazano u teoretskom delu rada, i promenama u strukturi, hemijski, ili na drugi način tretiranog dekstrana.

Tako, ukoliko bi se dekstran hemijski tretirao, tako što bi se OH grupe eterifikovale (kao kod CMD) ili esterifikovale (kao kod DS), dobili bi se proizvodi čiji spektri moraju da se razlikuju od polaznog dekstrana. Uvođenjem karboksimetil grupa (reakcijom dekstrana sa mono-hlor ili brom sirćetnom kiselinom u alkalnoj sredini) dobiće se karboksimetil dekstran (CMD) u čijem FTIR spektru, za razliku od polaznog dekstrana, treba očekivati trake od svih tipova vibracija karboksimetil grupe:

- traku od C=O vibracije na oko  $1740\text{ cm}^{-1}$ ,
- traku od deformacione C-OH koje se javljaju na oko  $1250\text{ cm}^{-1}$ ,
- traku od C-O vibracije na oko  $1150\text{ cm}^{-1}$ ,
- traku od C-O-C vibracije na oko  $1020\text{ cm}^{-1}$  etarske glikozidne veze,
- kao i onu od deformacione C=O vibracije oko  $680\text{ cm}^{-1}$ .

U literaturi se navodi samo traka od prvo navedene vibracije (Daniel-da-Silva i sar., 2009), dok o ostalim koje su važne za praćenje kompleksiranja metodom FTIR spektroskopije, tj. prirode eventualno obrazovanih helatnih prstenova, interakcija metal-ligand i geometrije kompleksa nema podataka. Upoređivanje spektara dekstrana i CMD koji su prikazani na Slici 16, pokazuje da u spektru CMD postoje trake na oko  $1740$ ,  $1245$ ,  $1140$ ,  $1020$  i  $682\text{ cm}^{-1}$ , (ove su označene strelicama) kojih nema kod dekstrana pa se mogu pripisati gore navedenim vibracijama. Dalje, intenzitet i položaj traka koje potiču od vibracije svih tipova hidroksilnih grupa dekstrana u spektru CMD treba da bude umanjen u zavisnosti od stepena eterifikacije što se vidi u oblasti  $\nu(\text{OH})$  oko  $3400\text{ cm}^{-1}$  i  $\delta(\text{C-OH})$  vibracija i  $\nu(\text{C-O})$ , u oblasti  $1400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ .



Slika 16. FTIR spektri dekstrana (a), CMD (b) i DS (c)

Za razliku od spektra CMD, u FTIR spektru DS očekuju se trake od vibracija svih tipova sulfo grupe. Prema literaturnim podacima (Se-Hui i sar., 2007; Cakić i sar., 2005; Mähner i sar., 2001; Liu i sar., 2009), prisustvo sulfo grupe u dekstranu i sličnim polisaharidima može se utvrditi na osnovu postojanja traka od vibracija svih tipova sulfo grupe, čija je asignacija prikazana u Tabeli 9, zajedno sa trakama od deformacionih CH vibracija glukopiranoznih prstena za  $^4C_1$  konformaciju.

Tabela 9. Asignacija traka sulfo grupe u dekstranu

	DS	Asignacija
Uzorak	1261 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}(\text{S}=\text{O})$
	988 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{s}}(\text{S}=\text{O})$
	824 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}(\text{O}-\text{S}-\text{O})$ , ekvatorijalan
	850 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}(\text{O}-\text{S}-\text{O})$ , aksijalan
	585 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{s}}(\text{O}-\text{S}-\text{O})$
	915 $\text{cm}^{-1}$	$^4C_1$ konformacija $\alpha$ -D-glukopiranoznog prstena
	850 $\text{cm}^{-1}$	
745 $\text{cm}^{-1}$		

Spektar natrijumove soli DS prikazan je na Slici 16c. Kao što može da se vidi, u njegovom spektru postoje trake navedene u Tabeli 9 koje su označene strelicama.

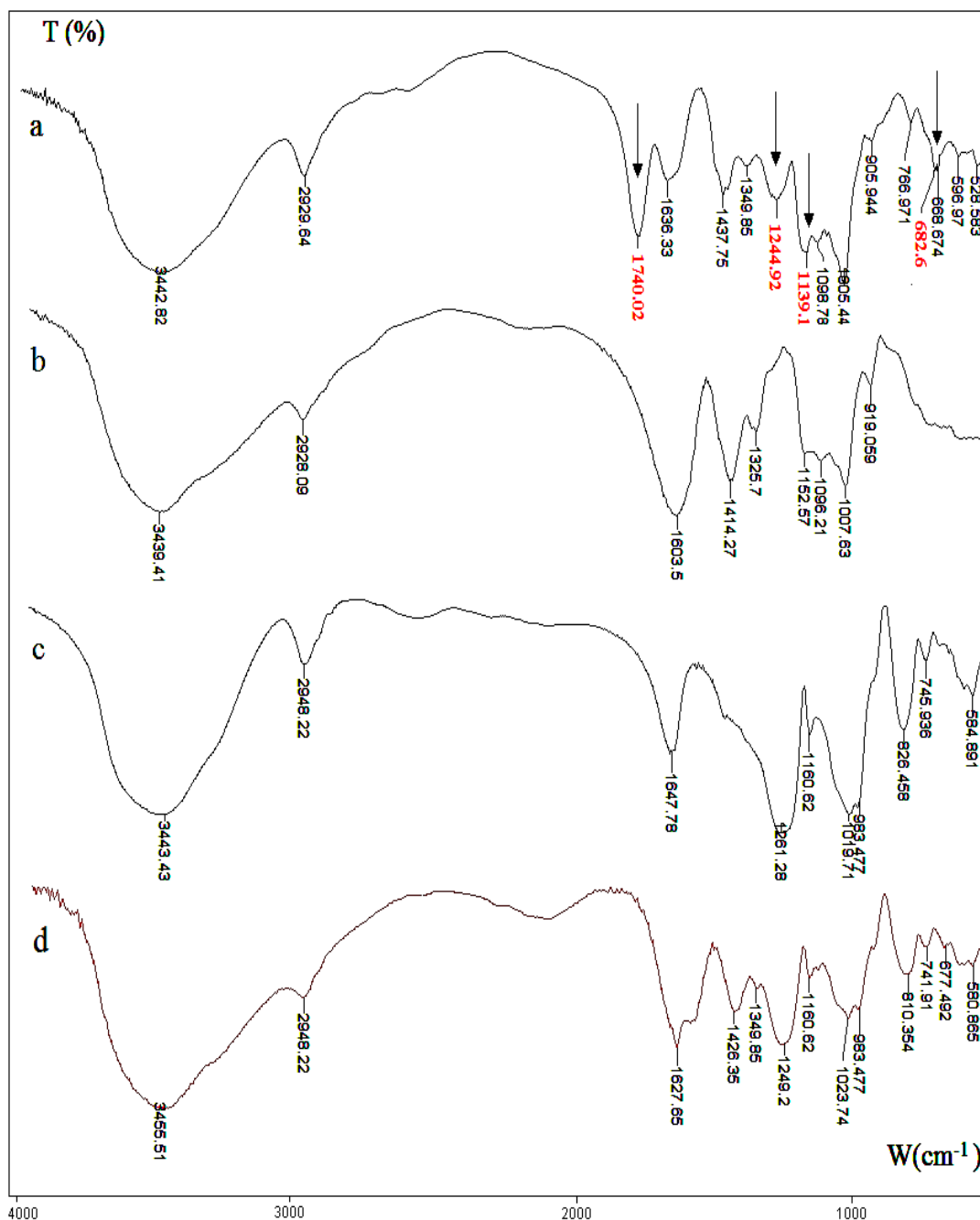
Treba napomenuti da, kada je sulfo grupa u aksijalnom položaju, javlja se traka na  $850\text{ cm}^{-1}$  dok je za ekvatorijalni položaju ona na oko  $820\text{ cm}^{-1}$ . Na osnovu ovog kriterijuma može se odrediti položaj sulfo grupe u ispitivanom DS ili eventualna promena položaja u toku sinteze.

Upoređivanje spektara CMD i DS kao kompleksirajućih liganada sa spektrima njihovog kompleksa sa jonima bakra, može da nam pruži informacije o uspešnosti sinteze, o strukturnoj geometriji i prirodi eventualno obrazovanih helatnih prstenova, o konformaciji glukopiranozne jedinice i načinu vezivanja vode. Naime, anjon CMD ili DS može sa metalnim katjonom da formira jedinjenja za koja, što se strukture tiče, postoje dve granične mogućnosti (v. Sl. 8):

- ✓ prva da su metalni kompleksi jonski građeni (tada bi spektar bio sličan spektru natrijumove soli DS, a razlika u frekvenciji  $\nu_{as}$  i  $\nu_s(\text{C=O})$  vibracija kod kompleksa CMD bi bila manja od  $100\text{ cm}^{-1}$ )(Palacios i sar., 2004),
- ✓ ili druga da su to helati, pri čemu priroda obrazovanih helatnih prstenova može da bude slična kompleksima  $\beta$ -diketona, kada je red veza C-C, C-O i M-O potpuno izjednačen ili da bude različit.

Dobar pokazatelj o uspešnosti sinteze, kao i načinu vezivanja odnosno prirode obrazovanja helatnih prstenova, mogu da pruže spektar strukturne korelacije u oblasti CO, odnosno SO vibracija svih tipova kod oba tipa kompleksa.

FTIR spektar kompleksa CMD sa jonom Cu(II) snimljen na sobnoj temperaturi prikazan je na Slici 17. U spektru kompleksa Cu-CMD, nema traka od deformacione  $\delta(\text{C-OH})$   $1245\text{ cm}^{-1}$ , niti one od valentne  $\nu(\text{C-O})$  vibracije  $1140\text{ cm}^{-1}$ , kao i od deformacione C=O vibracije oko  $682\text{ cm}^{-1}$ , što može biti dobar pokazatelj uspešnosti sinteze.



Slika 17. FTIR spektri CMD (a), Cu-CMD (b), DS (c) i Cu-DS (d)

Dalje, u oblasti  $\nu(\text{CO})$  vibracija nalazi se jedna široka intenzivna traka na oko  $1603 \text{ cm}^{-1}$  i druga nešto manje intenzivna na oko  $1414 \text{ cm}^{-1}$ . Ove trake prema svom položaju, obliku i intenzitetu treba pripisati asimetričnoj i simetričnoj valentnoj vibraciji C=O grupe, čiji je red

promenjen u odnosu na polazno jedinjenje CMD. Naime, u visokofrekventnoj vibraciji kod CMD na oko  $1740\text{ cm}^{-1}$ , udela pretežno ima valentna C=O vibracija, a u niže frekventnoj na oko  $1150\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C-O})$ , valentna vibracija. Ovo bi značilo da u koordinaciji kod obrazovanja kompleksa, učestvuju C=O sa slobodnim elektronskim parom i -OH grupom iz COOH preko koje se obrazuje kovalentna veza -O-M. Frekvencija  $\nu_{\text{as}}$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$  vibracija zavisi od koordinacije metalnog jona sa karboksilnom grupom iz liganda. Analiza položaja, intenziteta i razlika u frekvenciji ovih vibracija za O-donor ligande tipa kiselina dobar je pokazatelj dentatnosti karboksilne grupe u koordinaciji sa jonima tipa M(II), pa tako i Cu(II) (Dendrinom-Samara i sar., 1998; Agotegeray i sar., 2010; Agotegeray i sar., 2012b; Dimiza i sar., 2011; Tita i sar., 2011). Razlika u frekvenciji od oko  $185\text{ cm}^{-1}$  pokazuje da se karboksilna grupa CMD ponaša, verovatno, kao bidentatni ligand (v. Tab. 7)(Glišić i sar., 2015) pa je razumljivo da se usled delokalizacije elektrona red veze menja od liganda do kompleksa. Treba napomenuti da se u nekim radovima (Basuny i sar., 2015) navodi da je u slučaju bidentatne koordinacije razlika u frekvenciji manja od  $200\text{ cm}^{-1}$ , a za monodentatnu preko  $350\text{ cm}^{-1}$ , dok ako je razlika između ove dve vrednosti onda je karboksilna grupa između ova dva tipa koordinacije anizobidentatna. Delokalizacija elektrona unutar okruženja bakra nije potpuna, tako da je jedna CO veza karboksilne grupe pretežno dvostruka, a druga jednostruka, što ukazuje nešto povećana vrednost razlike u frekvenciji ovih vibracija, na šta su ukazali UV-Vis spektri ili moguće asimetrično helatno ponašanje koje može biti razlog tetragonalno deformisane oktaedarske koordinacije.

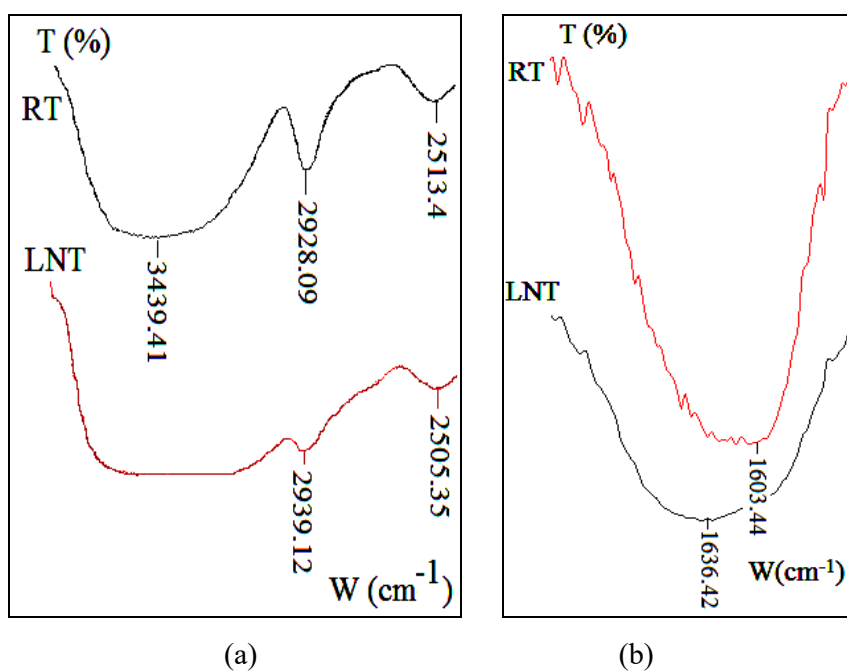
FTIR spektri DS u formi natrijumove soli i njegovog jedinjenja sa jonima bakra su u osnovi slični (v. Sl. 17), izuzev jasne razlike u frekvenciji  $\nu_{\text{as}}(\text{SO})$  vibracije. Naime, dok je traka od ove vibracije u spektru DS na oko  $1261\text{ cm}^{-1}$ , u spektru Cu-DS je ona na oko  $1249\text{ cm}^{-1}$ . Ova razlika u frekvenciji odgovarajuće vibracije liganda i kompleksa može da služi kao pokazatelj uspešnosti sinteze. Sličnost spektara, pak ukazuje na sličnu strukturu, tj. da je ovo jedinjenje pretežno jonskog karaktera, što ukazuje mala razlika u frekvenciji  $\nu_{\text{as}}(\text{SO})$  vibracije ( $12\text{ cm}^{-1}$ ) ova dva jedinjenja (mali udeo S=O u koordinaciji). U oblasti  $\nu_{\text{as}}(\text{O-S-O})$  vibracije u spektru kompleksa postoji traka na oko  $810\text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na ekvatorijalan položaj sulfo grupa kao u polaznom DS.

Imajući u vidu rezultate fizičko-hemijskih i UV-Vis ispitivanja, prema kojima je odnos liganda CMD i Cu(II)-jona 2:1, odnosno 1:1 kod jedinjenja Cu-DS, tetragonalno deformisanu oktaedarsku koordinaciju i bidentatnost liganda, koordinaciona sfera bakra treba biti



dopunjena do koordinacionog broja 6. To može biti postignuto molekulima vode ili drugih prisutnih jona u sistemu. Ukoliko je prisutna voda u strukturi, onda se očekuju i trake od vibracija svih tipova vode. U oblasti  $\nu(\text{OH})$  vibracija molekula vode, oko  $3600\text{ cm}^{-1}$  u svim spektrima postoji široka intenzivna traka sa više prevoja sa niže- i višefrekventne strane pa je teško na osnovu izgleda spektra u ovoj oblasti locirati traku od ove vibracije, utoliko više jer pored nje ovde padaju i trake  $\nu(\text{OH})$  vibracija,  $-\text{OH}$  grupa glukopiranoznih jedinica.

Zbog toga je primenjena tehnika izotopske izmene molekula vode onima  $\text{D}_2\text{O}$  i upoređivanje spektara hidrata i njihovih parcijalnih deuterisanih analoga. Naime, u spektru parcijalnog i deuterisanog analoga treba očekivati trake od svih tipova vibracija HOD, odnosno  $\text{D}_2\text{O}$  molekula koji u odnosu na hidrate treba da budu pomerene za faktor 1,4 prema nižim frekvencijama, a intenzitet traka u valentnoj HOH oblasti treba da bude proporcionalno umanjen u zavisnosti od stepena izotopske izmene. Spektar parcijalno deuteriranog analoga hidrata Cu-CMD prikazan je na Slici 18a. U oblasti  $\nu(\text{HOD})$  vibracija postoji traka na oko  $2510\text{ cm}^{-1}$ , čiji bi partner u  $\nu(\text{HOH})$  oblasti uzimajući u obzir faktor pomeranja 1,34 bio oko  $3400\text{ cm}^{-1}$ , ali je tačno lociranje ove trake teško zbog preklapanja ove onima od  $\nu(\text{OH})$  vibracija.



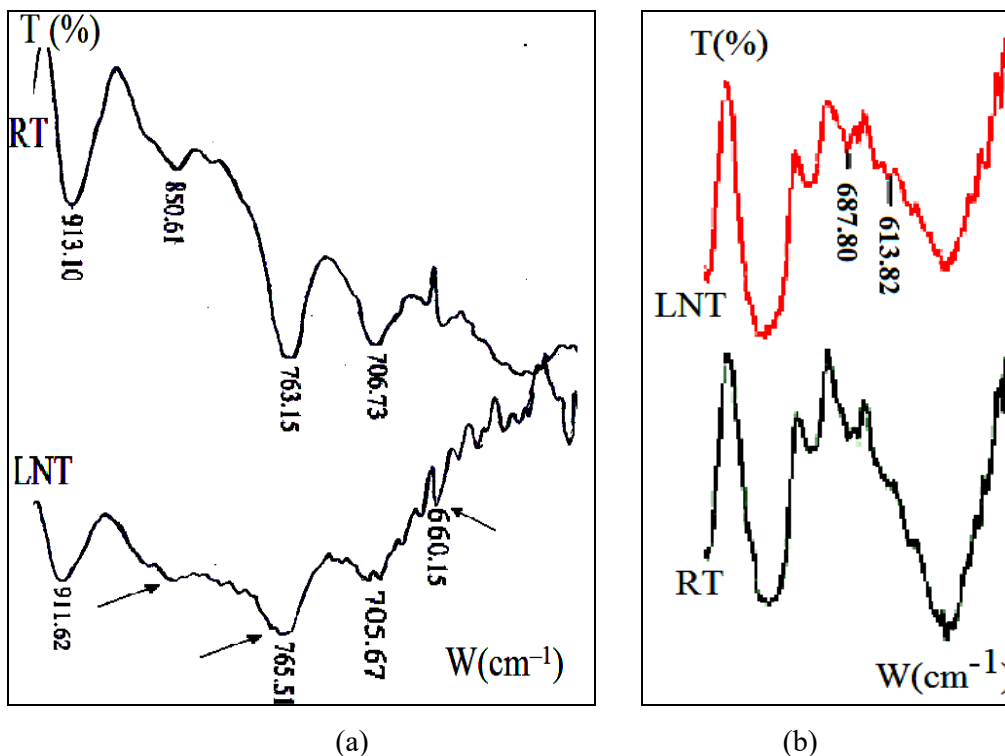
**Slika 18.** RT i LNT spektri Cu-CMD deuteriranog analoga hidrata u oblasti  $\nu(\text{HOH})$  (a) i  $\delta(\text{HOH})$  (b)

Prisustvo trake u spektru parcijalno deuteriranog analoga od  $\nu(\text{HOD})$  vibracije, ukazuje na prisustvo vode u strukturi ovog jedinjenja. Kao što je poznato (Falk i sar., 1969) predložili su kriterijume prema kojima je, na osnovu izučavanja spektara protonovanih, delimično i potpuno deuteriranih hidrata, moguće odrediti broj tipova molekula  $\text{H}_2\text{O}$  ( $n$ ) i broj neekvivalentnih OH grupa u njima ( $m$ ). Prema ovim kriterijumima, pojave jedne trake u  $\nu(\text{HOD})$  oblasti ukazuju da je u strukturi CMD i njegovog kompleksa sa Cu(II)-jonom prisutan jedan tip molekula vode,  $n=1$ . Na osnovu Berglund-ove korelacije (Berglund i sar., 1978) moguće je proceniti jačinu vodonikove veze koja je obrazovana protonima vode, tj.  $\text{O}_w \dots \text{O}$  rastojanje:  $\nu(\text{OD}) = 2727 - 8,97 \cdot 10^6 \cdot e^{-3,73 \cdot R(\text{O}_w \dots \text{O})}$ . Na osnovu frekvencije  $\nu(\text{HOD})$  vibracije,  $2510 \text{ cm}^{-1}$ , procenjeno  $\text{O}_w \dots \text{O}$  rastojanje bi iznosilo  $280 \text{ pm}$  kod Cu-CMD kompleksa.

Da se ne radi o apsorpcionoj vodi, već onoj u strukturi, ukazuje i oblast oko  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , u kojoj se očekuje traka od deformacione HOH vibracije koja treba da je osetljiva na sniženje temperature. Kako se može videti na Slici 18b, u LNT spektru traka na oko  $1630 \text{ cm}^{-1}$  pokazuje osetljivost na sniženje temperature. Naime, sniženje temperature izaziva promene u položaju i obliku trake na oko  $1600 \text{ cm}^{-1}$  koja ima kompleksnu strukturu, što može biti, verovatno, rezultat preklapanja traka od  $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$  vibracije sa onom  $\delta(\text{HOH})$  vibracijom. Sniženje temperature izaziva jasno razdvajanje na dve trake, jedna ne menja svoj položaj ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$ ) a druga se pomera prema višim frekvencijama,  $1630 \text{ cm}^{-1}$ , pa se može pripisati  $\delta(\text{HOH})$  vibraciji. Pošto je frekvencija viša od  $1600 \text{ cm}^{-1}$  smatra se da je u pitanju konstitucionalna voda, tj. koordinirana voda, a ne apsorpciona (Pejov i sar., 2001; Šoptrajanov i sar., 2002).

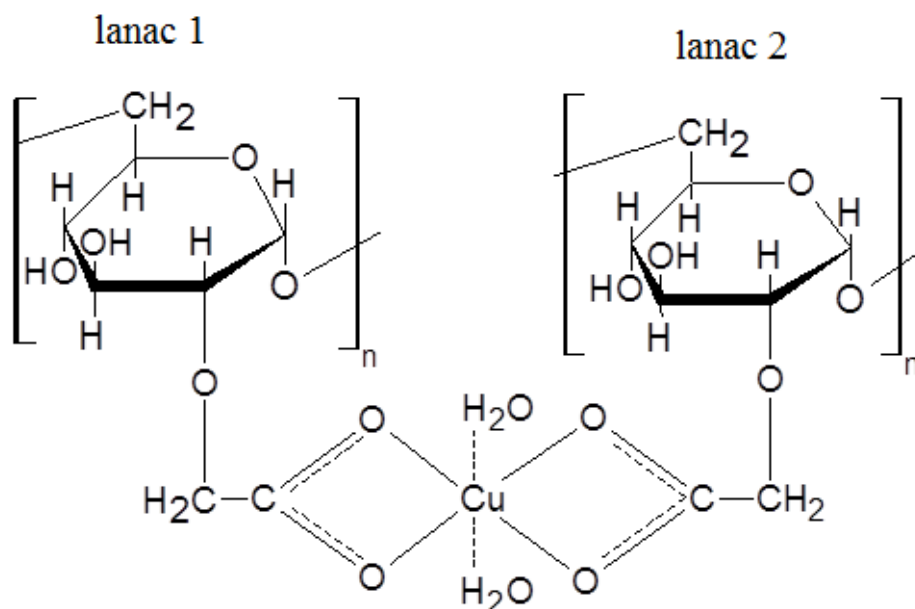
Dalju potvrdu prisustva ove konstitucione (koordinirane) vode može dati izučavanje nižefrekventnog dela spektra. Naime, razlika u izgledu spektara hidrata sa koordiniranom i nekoordiniranom vodom u strukturi je u tome što se kod jedinjenja sa koordiniranom vodom u nižefrekventnom delu spektra očekuju i trake od tzv. libracija molekula vode i to od tzv. *rocking*, *twisting*, *wagging* modova. Obično se javljaju dve trake, jedna u oblasti od  $1000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ , a druga  $600\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ . Trake od ovih libracija su slabog intenziteta s jedne strane, a s druge u ovoj oblasti se javljaju trake od drugih tipova vibracija pa je njihovo tačno lociranje teško, ali pošto je njihov intenzitet i položaj osetljiv na sniženje temperature, upoređivanje spektara snimljenih na sobnoj RT i LNT može pomoći njihovu detekciju. Prema ovom kriterijumu u niskotemperaturnom spektru Cu-CMD kandidati za ove libracije mogu da budu

trake oko, 860, 770  $\text{cm}^{-1}$  (prevoj), 660  $\text{cm}^{-1}$  (v. Sl. 19a), a kod Cu-DS na oko 680 i 610  $\text{cm}^{-1}$  (v. Sl. 19b), što bi značilo da se i kod kompleksa Cu-DS koordinaciona sfera bakra dopunjuje molekulima vode.



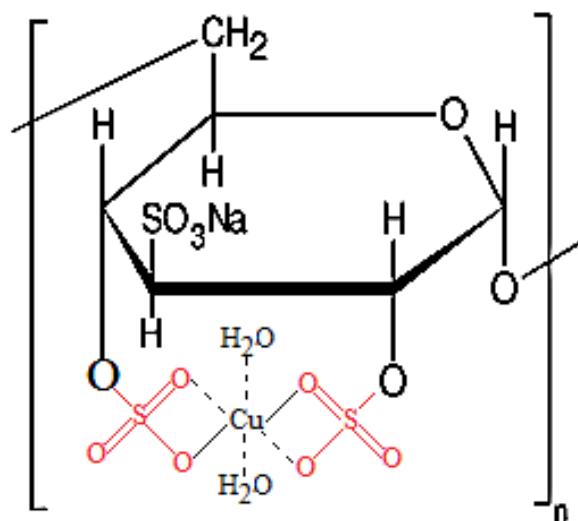
**Slika 19.** RT i LNT FTIR spektri kompleksa Cu sa CMD (a) i DS (b) u oblasti libracija molekula vode

Ova činjenica upućuje na to da u strukturi postoje najverovatnije dva koordinirana molekula vode koja dopunjuju koordinacionu sferu Cu(II) do 6, čiji su protoni uključeni u obrazovanje relativno slabih vodoničnih veza. Uzimajući u obzir stehiometriju kompleksa i  $O_h$  okruženja Cu(II)-jona, kompleks Cu-CMD se formira deprotonacijom monomerne jedinice CMD, tako da se nalazi u oblasti od četiri O atoma iz dve karboksilne grupe, dva polimerna lanca i dva O atoma, iz dva koordinirana molekula vode, što bi odgovaralo  $\text{Cu(II)} \cdot (\text{CMD})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$  stehiometriji kompleksa (Glišić i sar., 2015), kao što je prikazano na Slici 20.



**Slika 20.** Strukturni model Cu-CMD kompleksa, sa šest atoma O-donora u tetragonalnom  $O_h$  okruženja Cu(II)-jona

U Cu-DS kompleksu, verovatno su Cu(II)-joni u oblasti od četiri O atoma dve susedne sulfo grupe istih monomernih jedinica, i dva O atoma iz dva koordinirana molekula vode na šta ukazuje ispitivanje nižefrekventnog dela spektra. U nižefrekventnoj oblasti, oblast ispod  $800\text{ cm}^{-1}$ , kod kompleksa bi se očekivale trake od valentnih M-O vibracija, čiji bi položaj bio osetljiv na prirodu metala. Međutim, zbog postojanja slabih traka od deformacionih vibracija glukopiranozne jedinice, u ovoj oblasti njihovo lociranje nije moguće na empirijski način. Imajući u vidu određen molski odnos  $\text{Cu} : \text{DS} \sim 1:1$ , prisustvo molekula vode u strukturi, kao i analizu IR spektara koja je pokazala da je jedinjenje pretežno jonsko po svojoj prirodi, stehiometrija ovog jedinjenja bi bila:  $\text{Cu(II)·DS·(H}_2\text{O)}_2$  (Glišić i sar., 2015), a verovatna struktura je prikazana na Slici 21.



**Slika 21.** Strukturni model Cu-DS kompleksa, sa šest atoma O-donora u tetragonalnom  $O_h$  okruženja Cu(II)-jona

Oblast deformacionih CCH vibracija van ravni od  $1000$  do  $700\text{ cm}^{-1}$  kuplovanih sa C-C-O, O-C-O i C-O-C vibracijama posebno je važna za strukturalna ispitivanja polisaharida, njihovih derivata i jedinjenja sa M(II)-jonima, jer daje podatke o tipu glikozidne veze i konformaciji monosaharidne (glukopiranozne) jedinice (Barker i sar., 1953; Cakić i sar., 2008). Tako za  $\alpha$ -1,6 veze u ovoj oblasti postoje dve trake srednjeg intenziteta, jedna na oko  $916\text{ cm}^{-1}$ , a druga na oko  $765\text{ cm}^{-1}$ . Za  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,4 (koje ukazuju na račvanje) veze postoje trake na oko  $794\text{ cm}^{-1}$  i  $759\text{ cm}^{-1}$ , respektivno. Ukoliko bi se obrazovala  $\beta$ -D-glikozidna veza, tada je spektralna slika u ovoj oblasti drugačija, onda postoji jedna traka na  $896\text{ cm}^{-1}$ , dok ako su prisutne i  $\alpha$ -1,4 veze tada u spektru postoje trake na  $759 \pm 3\text{ cm}^{-1}$  i  $730 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ . U spektrima CMD, DS i njihovih kompleksa sa Cu, u ovoj oblasti  $\gamma(\text{C-H})$  postoje trake na oko  $920\text{ cm}^{-1}$ ,  $760\text{ cm}^{-1}$  i oko  $850\text{ cm}^{-1}$ . Prema napred iznesenim kriterijumima, moglo bi da se zaključi da je kod svih jedinjenja u pitanju  ${}^4C_1$  konformacija glukopiranozne jedinice, što znači da u toku sinteze kompleksa nije bilo konformacionih prelaza, kao i da su ligandi i kompleksi sa visokim sadržajem  $\alpha$ -1,6 veza, što ukazuje na visoku linearnost polisaharidnog liganda.

## 4.2. Fizičko-hemijske karakteristike kompleksa biometala Co sa CMD i DS

### 4.2.1. Određivanje stehiometrije kompleksa

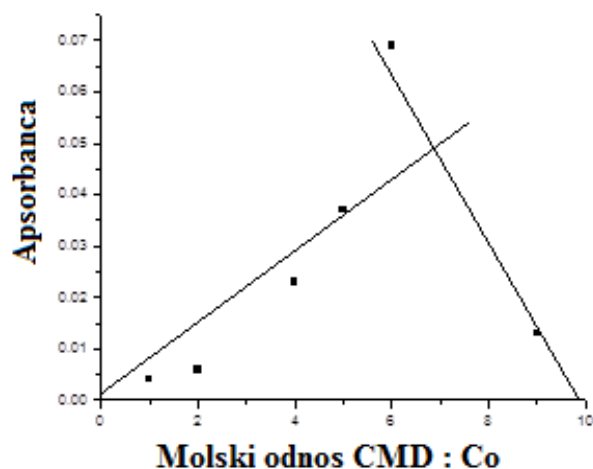
Karakterizacija sintetisanih kompleksa kobalta vršena je primenom istih metoda koje su korišćene u slučaju kompleksa bakra sa CMD i DS, a rezultati su prikazani i u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Fizičko-hemijske karakteristike kompleksa Co

Kompleks	Sadržaj Co (%)		Prinos (%)	Molski odnos M:L	$\lambda_{\max}$ / nm	Boja kompleksa
	10 min.	60 min.				
Co-CMD	5,2	12,14	76,51	1:2	250, 510	roze
Co-DS	3,61	10,7	67,44	1:1	254, 500	roze

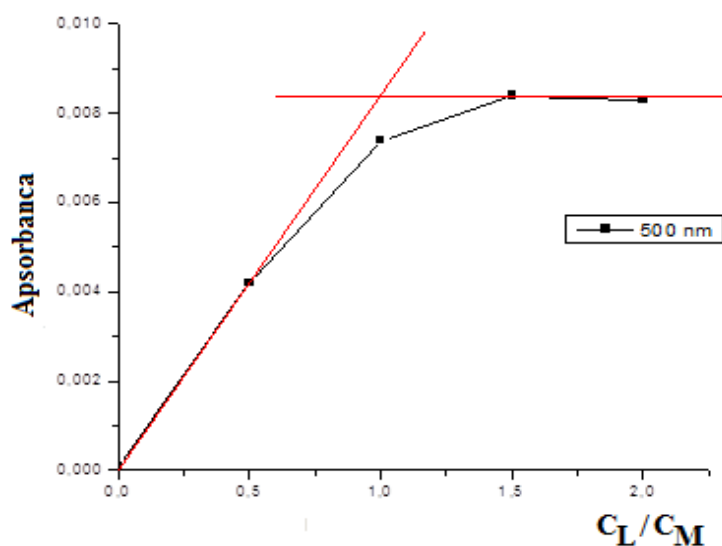
I u ovom slučaju maksimalni sadržaj metala postignut je posle 60 minuta sinteze, ali su prinos i sadržaj metala nešto veći i približan za oba tipa kompleksa kobalta. Na osnovu eksperimentalno dobijenog sadržaja kobalta može se zaključiti da je kod kompleksa Co-CMD odnos kobalta prema CMD 1:2, a kod jedinjenja Co-DS ~ 1:1. Boja rastvora u toku sinteze promenila se od bezbojne do roze, što može da posluži kao pokazatelj uspešnosti ishoda sinteze s jedne, a s druge strane da se formiraju oktaedarski kompleksi Co u slabom ligandnom polju  $O_h$  tipa koji su zbog apsorpcije u Vis oblasti (500 i 510 nm) obojeni slabo ružičastom bojom, kako je to ranije diskutovano. Naime, traka od ovog prelaza je slabo intenzivna. U jakom ligandnom polju se formiraju  $T_d$  oktaedarski kompleksi (polje jače od  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) koji imaju intenzivnu plavu boju (Mitić, 2009).

Na isti način kao kod karakterisanja odgovarajućih jedinjenja bakra primenom Jobb-ove metode kod kompleksa Co-CMD i primenom metode molskog odnosa kod Co-DS, određen je odnos metal : ligand. Rezultati određivanja odnosa metala i liganda kompleksa Co-CMD prema Jobb-ovoj metodi dobijeni su mešanjem osnovnih rastvora u različitom molskom odnosu, a merenja apsorbanacije vršeno je na 510 nm (v. Sl. 22). Najveća apsorbanca je izmerena kod kompleksa zapreminskog odnosa 6,6:3,4 što bi odgovaralo molskom odnosu Co : CMD ~ 1:2 pa bi i u ovom slučaju koordinaciona sfera kobalta mogla da bude dopunjena molekulima vode do  $O_h$  tipa kompleksa.



**Slika 22.** Primena Jobb-ove metode za određivanje odnosa M:L (na apscisi su prikazane zapremine rastvora liganda, a zapremine rastvora metala su dopuna do 10 ml).

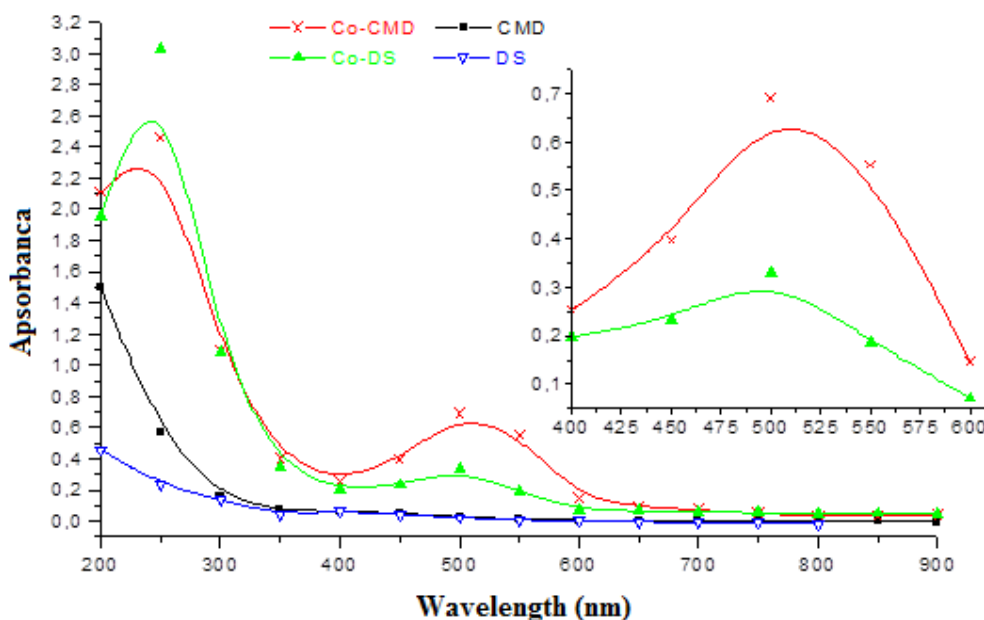
Pošto su preliminarna ispitivanja i u ovom slučaju pokazala da je kompleks Co-DS nestabilan za određivanje odnosa kobalta i DS, primenjena je metoda molskog odnosa, a merenje apsorbancije rastvora u različitim molskim odnosima vršeno je na 500 nm. Rezultati ovih ispitivanja prikazani na Slici 23. U ovom slučaju tačka preloma koja određuje molski odnos, kako je u teoretskom delu opisano, jeste za odnos metal : ligand  $\sim 1:1$ , pa bi i kod ovog jedinjenja koordinaciona sfera metala mogla da bude dopunjena do  $O_h$  tipa, najverovatnije, molekulima vode.



**Slika 23.** Primena metode molskog odnosa M:L kompleksa Co-DS.

#### 4.2.2. Spektar strukturne korelacije primenom metode UV-Vis spektrofotometrije

Spektri u UV-Vis oblasti kompleksa kobalta sa CMD i DS prikazani su na Slici 24. Kao što se vidi kod kompleksa se, slično onima bakra, javljaju trake u UV oblasti kojih nema kod liganada, i najverovatnije potiču od  $n \rightarrow \pi^*$  i  $\pi \rightarrow \pi^*$  prelaza karboksilne, odnosno sulfo grupe (njihove talasne dužine su kod kompleksa Co-DS na oko 254 nm, a kod Co-CMD na 250 nm). U odnosu na polazne ligande kod kompleksa pokazuju batohromni i hiperhromni efekat, koje ukazuju na pojavu interakcija ligand-metal, odnosno formiranje koordinativne veze pa mogu da služe kao kriterijum uspešnosti sinteze. Dalje, apsorpcioni maksimumi pokazuju hipsokromni efekat u odnosu na odgovarajuća jedinjenja bakra, što ukazuje na jače interakcije Co-O u odnosu na one Cu-O. Ako se upoređuje položaj apsorpcionog maksimuma jedinjenja kobalta koji je niži kod jedinjenja Co-DS, može se zaključiti da su interakcije Co-O (veza) jače kod jedinjenja Co-DS u odnosu na one kod Co-CMD.



Slika 24. UV-Vis spektri CMD, DS i njihovih kompleksa sa biometalom Co

U vidljivoj oblasti spektra javlja se široka traka kod Co-CMD, na  $\lambda_{\max} = 510$  nm, a za Co-DS na 500 nm. Ove trake se, najverovatnije, mogu pripisati većem broju po spinu dozvoljenih, a po energiji bliskih prelaza kao jedinstvena nesimetrična apsorpciona traka,  $d \rightarrow d$  prelazu

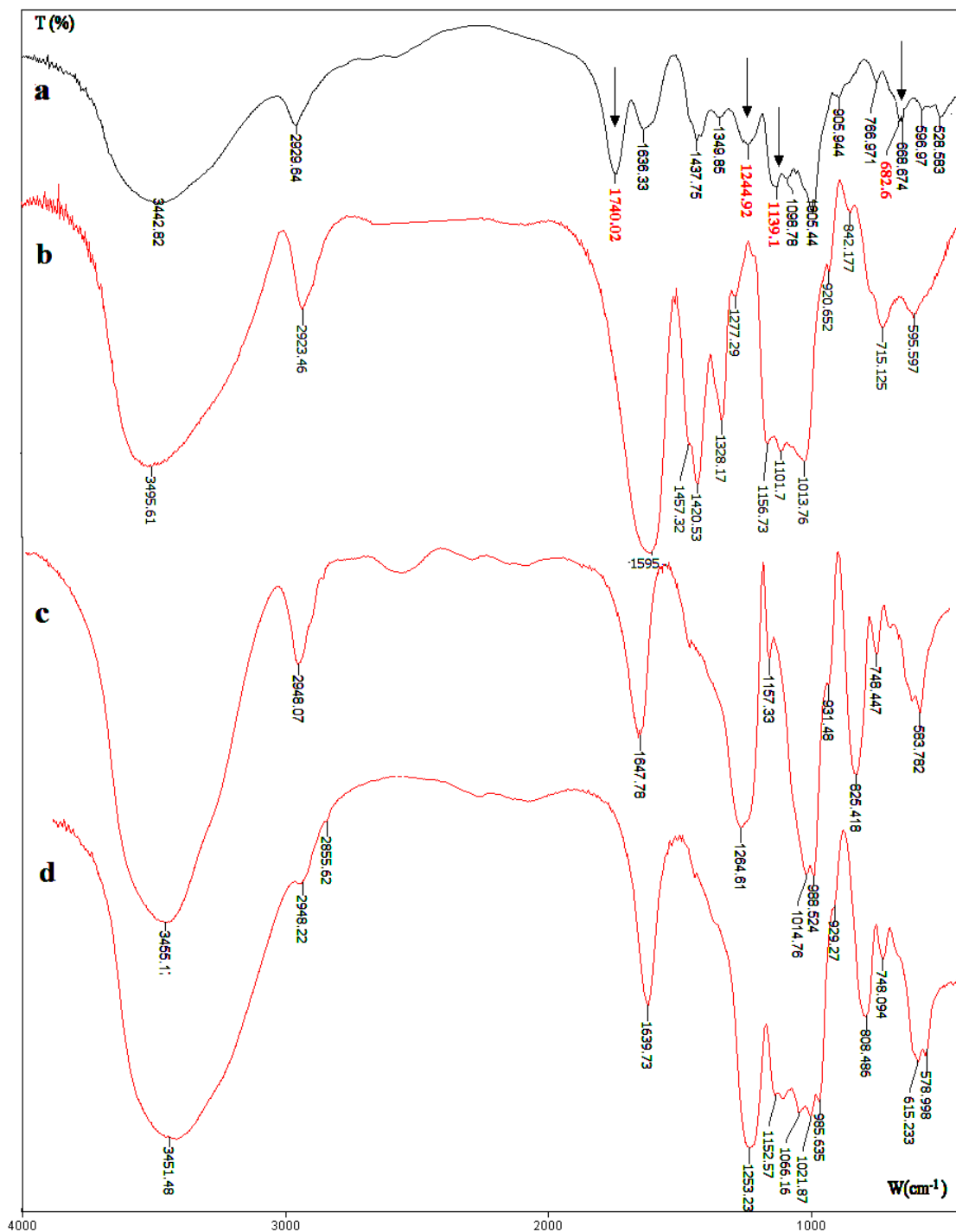


naelektrisanja sa O donor atoma liganda na M(II)-jon, što opet ukazuje na kompleksiranje. Po kvantnomehničkim pravilima izbora  $d \rightarrow d$  prelaz je zabranjen, a činjenice pokazuju da on stvarno postoji. Ovi prelazi su po selekcionim pravilima zabranjeni (zbog iste simetrije svih  $d$  orbitala) pa su slabo intenzivni. Pojava slabo intenzivne trake se tumači preklapanjem  $d$  orbitala centralnog metalnog jona sa  $p$  orbitalama liganda, pa su ustvari ovo  $p \rightarrow d$  prelazi koji su zbog slabih interakcija orbitala slabi po intenzitetu, ali njihova pojava na ovim talasnim dužinama govori u prilog obrazovanju oktaedarskih kompleksa.

### 4.2.3. Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije

Analiza infracrvenih spektara sintetisanih jedinjenja kobalta vršena je na empirijski način tj. na osnovu literaturnih podataka i međusobnim upoređivanjem spektara polaznih jedinjenja dekstrana, karboksimetil dekstrana, dekstran sulfata i kompleksa o kojoj je već bilo reči kod kompleksa Cu. Spektri CMD (a), Co-CMD (b), DS (c) i Co-DS (d) prikazani su na Slici 25. U oblasti valentnih CO vibracija intenzivne trake su od valentnih CO vibracija na nižim frekvencijama u spektru kompleksa u odnosu na sam CMD, dok ih u spektru Co-DS razumljivo nema. Frekvencije traka u spektru jedinjenja Co-CMD oblasti valentnih CO vibracija iznose: za višefrekventnu  $1595\text{ cm}^{-1}$ , a za drugu nižefrekventnu  $1420\text{ cm}^{-1}$ . Ove trake prema svom položaju, obliku, intenzitetu i osetljivosti na prirodu metala (vidi diskusiju kod odgovarajućeg jedinjenja bakra) treba pripisati simetričnoj i asimetričnoj vibraciji karboksilne grupe, čiji je red promenjen u odnosu na polazno jedinjenje CMD. Naime, u višefrekventnoj traci kod CMD, čija je frekvencija  $1740\text{ cm}^{-1}$ , pretežno ima udela valentna C=O vibracija, a u nižefrekventnoj čiji je položaj na  $1240\text{ cm}^{-1}$  valentna C-O vibracija. Ovo bi značilo da u koordinaciji kod obrazovanja kompleksa učestvuju C=O sa slobodnim elektronskim parom i -OH grupa iz COOH, preko koje se obrazuje kovalentna veza -O-M, ali tako da je red prve veze snižen, a red druge veze povećan najverovatnije zbog delokalizacije unutar obrazovanih helatnih prstenova. Prema frekvenciji ovih traka može se zaključiti da je i kompleks kobalta sa CMD-a po prirodi obrazovanog helatnog prstena približan onom kod  $\beta$ -diketona, na šta ukazuje i razlika u frekvenciji dveju CO vibracija koja je oko  $180\text{ cm}^{-1}$ . Ova razlika, kako je ranije navedeno, pokazuje da se i u ovom slučaju CMD ponaša kao bidentatni ligand. Pri tome treba imati u vidu stehiometriju kompleksa koja, kao kod odgovarajućeg

kompleksa bakra, može da bude dopunjena molekulima vode. U tom slučaju trebalo bi očekivati u FTIR spektrima trake od svih tipova vibracija molekula vode.



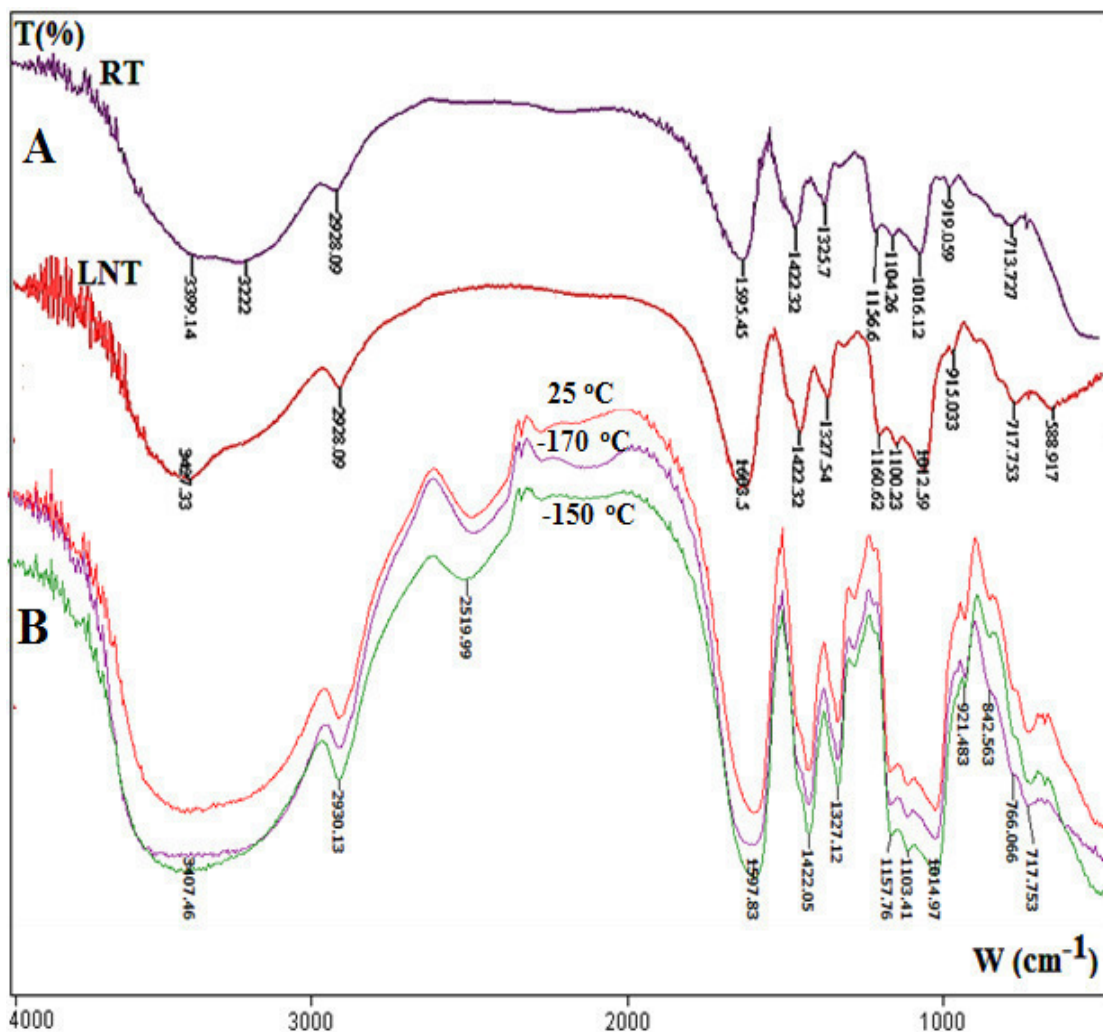
Slika 25. FTIR spektri CMD (a), Co-CMD (b), DS (c) i Co-DS (d)

FTIR spektri DS u formi natrijumove soli i njegovog jedinjenja sa jonima kobalta u osnovi su slični (v. Sl. 25) i slični jedinjenju Cu-DS, izuzev jasne razlike u frekvenciji  $\nu_{\text{as}}(\text{SO})$  vibracije. Naime, dok je traka od ove vibracije u spektru DS na oko  $1261\text{ cm}^{-1}$ , u spektru Co-DS ona je na oko  $1253\text{ cm}^{-1}$ , odnosno nešto je viša nego li kod Cu-DS. Ova razlika u frekvenciji odgovarajuće vibracije liganda i kompleksa pokazatelj je uspešnosti sinteze. Sličnost spektara ukazuje na sličnu strukturu, tj. da je i ovo jedinjenje pretežno jonskog karaktera (mala razlika u frekvenciji  $\nu_{\text{as}}(\text{SO})$  vibracije DS i Co-DS). U oblasti  $\nu_{\text{as}}(\text{O-S-O})$  vibracije u spektru kompleksa postoji traka na oko  $808\text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na ekvatorijalan položaj sulfo grupa kao u polaznom DS.

Spektralna slika u oblasti OH vibracija je sledeća: kod jedinjenja Co-CMD postoji traka na oko  $3495\text{ cm}^{-1}$  sa jasnim prevojem na  $3240\text{ cm}^{-1}$  i više prevoja sa više frekventne strane koji su osetljivi na sniženje temperature pa ih svakako treba pripisati valentnim OH vibracijama hidroksilnih grupa ili molekula vode (v. Sl. 26A). Kod Co-DS u ovoj oblasti postoji traka na oko  $3455\text{ cm}^{-1}$  (v. Sl. 27). S obzirom na kompleksni izgled ove trake teško je bez dodatnih podataka tačno odrediti poreklo traka odnosno, koje potiču od valentnih OH vibracija vode, a koje od  $-\text{OH}$  grupa.

Radi razjašnjenja ove dileme snimljeni su spektri na sobnoj i temperaturi ključanja tečnog azota kompleksa kobalta sa CMD i DS, kao i parcijano deuteriranog analoga hidrata kompleksa kobalta sa CMD.

U prilog postojanja vode u strukturi Co-CMD govori izgled spektra deuterisanog analoga hidrata ovog jedinjenja koji su snimljeni na različitim temperaturama. Naime, u spektrima parcijalno deuterisanog analoga hidrata (v. Sl. 26B) nalazi se traka oko  $2500\text{ cm}^{-1}$  koju treba pripisati valentnoj HOD vibraciji, što potvrđuje i njena osetljivost na sniženje temperature i očekivani faktor pomeranja. Na osnovu frekvencije ove trake može se zaključiti da su molekuli vode vezani slično onima kod jedinjenja Cu-CMD (v. Sl. 18).



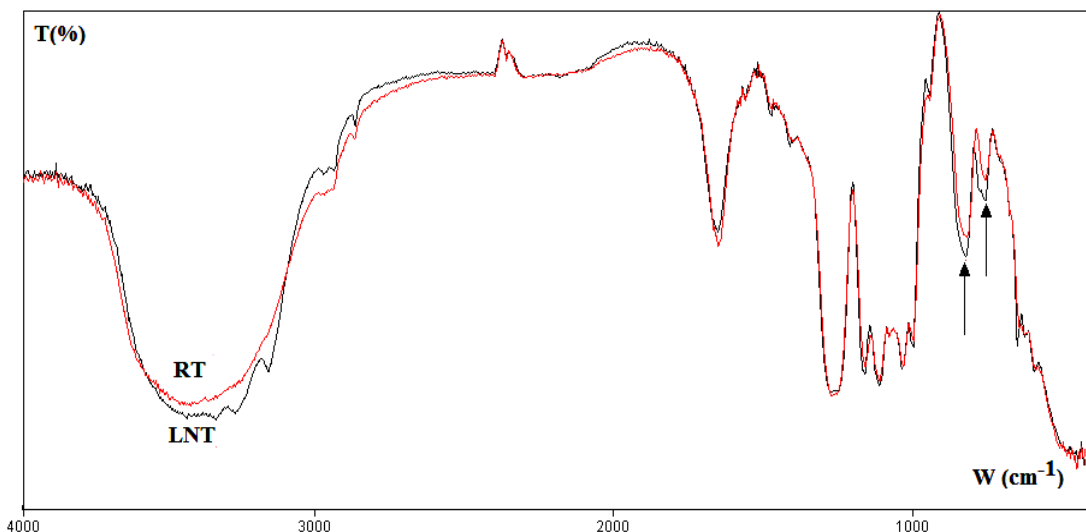
**Slika 26.** RT i LNT FTIR spektri kompleksa Co-CMD (A) i parcijalno deuteriranih analoga hidrata snimljenih na različitim temperaturama 25 °C, -150 °C i -170 °C (B)

Da je u strukturi prisutna voda pokazuje izgled spektra u oblasti deformacionih HOH vibracija. U oblasti deformacione HOH vibracije kod Co-CMD postoji široka intenzivna traka na oko 1595 cm<sup>-1</sup>, a kod Co-DS na 1639 cm<sup>-1</sup>, (u spektru DS na 1647 cm<sup>-1</sup>) koja se može slično asignirati kao ona kod Cu-CMD, tj. može se pripisati deformacionoj HOH vibraciji (v. Sl. 27). Ovakva spektralna slika ukazuje na to da su pored OH grupa u strukturi kompleksa, verovatno, prisutni i molekuli vode za koje je moguće da dopunjuju koordinacionu sferu metala. Naime, ako je u strukturi prisutna voda, u spektru treba da postoji traka na oko 1640 cm<sup>-1</sup> od deformacione HOH vibracije, s tim što koordinirana voda daje traku u oblasti 1640-1620 cm<sup>-1</sup> kao u našem slučaju kod Co-DS (v. Sl. 27). Ako se radi

o kristalnoj (nekoordiniranoj) vodi oblast je nešto niža 1630-1600  $\text{cm}^{-1}$ , mada u literaturi postoje i opisani slučajevi kada je frekvencija još niža. U slučaju Co-CMD teško je locirati traku od ove vibracije zbog preklapanja sa trakom od  $\nu_{\text{as}}(\text{CO})$  vibracije.

Razlika u izgledu spektara hidrata sa koordiniranom i nekoordiniranom vodom u strukturi je u tome što se kod jedinjenja sa koordiniranom vodom u nižefrekventnom delu spektra očekuju i trake od tzv. libracija vode i to od tzv. *rocking, twisting, wagging*. Trake od ovih libracija su slabog intenziteta s jedne strane, a s druge u ovoj oblasti se javljaju trake od drugih tipova vibracija pa je njihova detekcija izvršena upoređivanjem spektara Co-CMD snimljenih na sobnoj i LNT. U niskotemperaturnom spektru, kandidati za ove libracije prema osetljivosti bile bi trake jedna na oko 717  $\text{cm}^{-1}$ , a druga na oko 588  $\text{cm}^{-1}$  (v. Sl. 26).

Infracrveni spektri kompleksa kobalta sa DS snimljeni na sobnoj temperaturi i LNT prikazani su na Slici 27. Na sniženje temperature osetljiva je traka kompleksne strukture oko 3400  $\text{cm}^{-1}$ , ali i traka na oko 1640  $\text{cm}^{-1}$  koju treba pripisati deformacionoj vibraciji koordiniranih molekula. U prilog ovakvom zaključku jasna je pojava slabih traka od libracija molekula kojima odgovaraju trake na oko 810 i 748  $\text{cm}^{-1}$  (ove su na Slici 27 označene strelicama).



Slika 27. RT i LNT FTIR spektri kompleksa Co-DS

Sve ovo upućuje na to da u spektru postoje najverovatnije dva koordinirana molekula vode, na šta upućuje prisustvo traka od libracija i osetljivost traka na sniženje temperature u valentnoj i deformacionoj OH oblasti.

U nižefrekventnoj oblasti, oblast ispod  $600\text{ cm}^{-1}$ , kod kompleksa bi se očekivale trake od valentnih M-O vibracija, čiji bi položaj bio osetljiv na prirodu metala. Međutim, zbog postojanja slabih traka od deformacionih vibracija glukopiranozne jedinice u ovoj oblasti njihovo lociranje nije moguće na empirijski način.

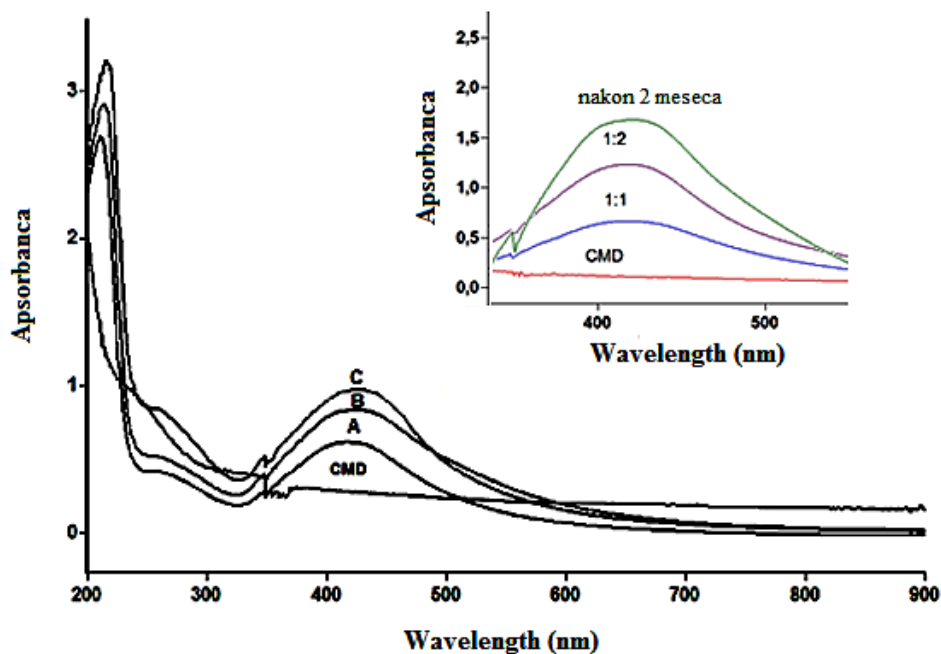
U spektrima kompleksa u oblasti  $\gamma(\text{C-H})$  vibracije postoje trake kod jedinjenja Co-CMD na oko  $920\text{ cm}^{-1}$ ,  $768\text{ cm}^{-1}$  i  $842\text{ cm}^{-1}$  (slično je i kod jedinjenja Co-DS). Prema ranije iznesenim kriterijumima moglo bi da se zaključi da u toku sinteze kompleksa nije bilo konformacionih prelaza, tj. da je u pitanju  ${}^4\text{C}_1$  konformacija glukopiranozne jedinice, takođe, i da su kompleksi sa visokim sadržajem  $\alpha$ -1,6 veza, odnosno, visoka linearnost polisaharidnog liganda.

Napred navedene činjenice ukazuju na stehiometriju kompleksa sličnu onoj kod odgovarajućih jedinjenja bakra tj.  $\text{Co(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2$  i  $\text{Co(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2$  (Glišić i sar., 2015).

### **4.3. Nanočestice AgNPs-CMD**

#### **4.3.1. UV-Vis spektrofotometrija**

Kao što je u uvodnom delu navedeno, CMD i DS ispunjavaju uslove da mogu da redukuju jone srebra do elementarnog srebra, pri čemu istovremeno sprečavaju aglomeraciju formiranih AgNPs. Uspešnost sinteze se vizuelno prati promenom boje reakcione smeše od bezbojne do žućkasto-braon boje, što je razumljivo, jer čestice AgNPs pokazuju prelaze u vidljivoj oblasti spektra, 370-450 nm. Metode apsorpcione UV-Vis spektrofotometrije koriste se za njihovu karakterizaciju. Apsorpcioni spektri AgNPs-CMD, dobijeni iz različitih molskih odnosa srebra i CMD, snimani u oblasti talasne dužine 200-900 nm prikazani su na Slici 28.



**Slika 28.** UV-Vis spektar CMD, AgNPs-CMD čestica dobijenih pri molskom odnosu 1:1 (A), 1:2 (B) i nanočestica nakon 2 meseca (C)

Odmah se može primetiti da je UV oblast (do 300 nm) skoro identična onoj kod ranije diskutovanih spektara kompleksa bakra i kobalta sa CMD. Naime, i u ovom slučaju  $n-\pi^*$  prelaz na oko 190 nm (Ahmad i sar., 2011) CMD nije detektovan u analiziranom UV-Vis spektru. Međutim, UV-Vis spektri AgNPs-CMD sadrže apsorpcionu traku na oko 215 nm, koja se najverovatnije može pripisati  $n-\pi^*$  prelazu karboksilne grupe, za koju je energija prelaza niža nego za CMD ili  $\text{AgNO}_3$ , što ukazuje na interakcija  $\text{Ag}^+$  jona i CMD.

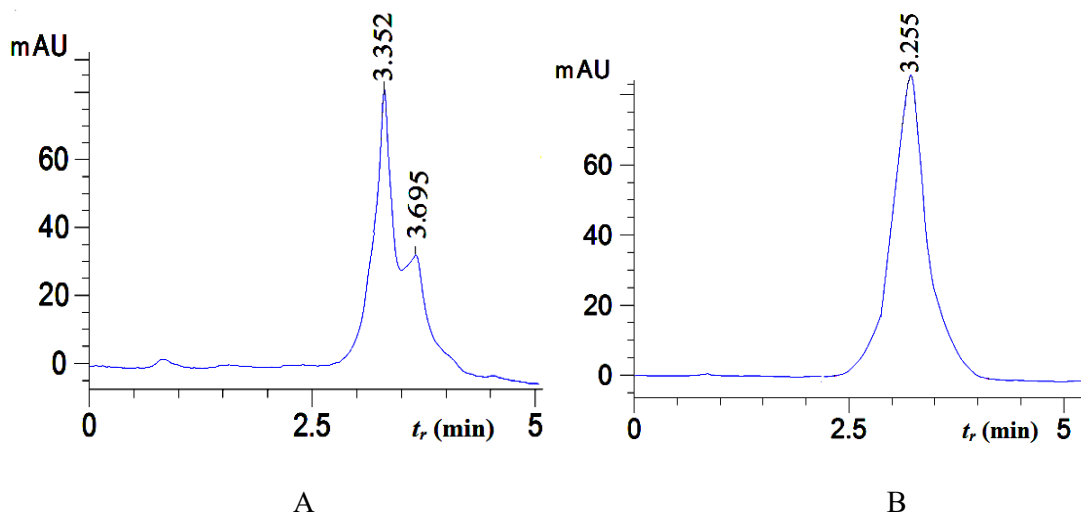
Dalje, u Vis oblasti apsorpcionog spektra AgNPs, za razliku od onog CMD postoji intenzivna traka na oko 420 nm. Ovo je oblast u kojoj čestice AgNPs pokazuju prelaze, a apsorpciona traka se označava kao SPR traka, a rezultat je, kako je to ranije navedeno, kolektivne plazmonske rezonance. Postojanje ove trake u spektru u oblasti 370-450 nm smatra se kriterijumom koji ukazuje da su formirane AgNPs. Tačan položaj trake u UV-Vis spektru zavisi od prečnika čestice AgNPs, a njen intenzitet proporcionalno od količine (Trindade i Daniel-Da-Silva, 2011; Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013; Wei i sar., 2009; Tran i sar., 2010; Venediktov i Padokhin, 2008). Na osnovu relacije (<http://nanocomposix.eu/>) koja je prikazana na Slici 11, veličina AgNPs iznosila bi od 20-40 nm.

Faktori kao što su temperatura, molski odnos, pH, dielektrična svojstva, veličina i oblik čestica određuju apsorpciju i poziciju SPR traka (Bankura i sar., 2012; Wei i sar., 2009). Formiranje AgNPs čestica zavisi od odnosa  $\text{AgNO}_3 / \text{CMD}$ , kao što navode i drugi autori kod sinteze sličnih sistema (Trindade i Daniel-Da-Silva, 2011; Wei i sar., 2009; Tran i sar., 2010; Quelemes i sar., 2013), pa je zbog toga uticaj molskog odnosa ispitivan za dva različita odnosa:  $\text{AgNO}_3 : \text{CMD} \sim 1:1$  (A) i  $1:2$  (B). Rezultati prikazani na Slici 28 pokazuju da je apsorpcija za jedinjenje sa molskim odnosom  $\text{AgNO}_3 : \text{CMD} \sim 1:2$  veća nego u slučaju sa molskim odnosom  $1:1$ .

Promene u intenzitetu i položaju maksimalne apsorpcione trake nisu uočene čak ni nakon perioda od 2 meseca za AgNPs-CMD, dobijen pri molskom odnosu  $1:2$ , pa ova činjenica ukazuje na dobru stabilnost AgNPs-CMD.

#### 4.3.2. Gel permeaciona hromatografija (GPC-SEC)

Metodom GPC analizirani su polazni ligand CMD i AgNPs-CMD u cilju karakterizacije polaznih komponenti i definisanja molarne mase AgNPs-CMD (v. Sl. 29). U slučaju CMD mogu se videti dve frakcije na 3,352 i 3,695 minuta. U GPC hromatogramima AgNPs-CMD uočeno je postojanje jedne frakcije uniformne raspodele na 3,255 minuta. U ovom slučaju, odgovarajući ligand za sintezu AgNPs-CMD je frakcija CMD od 3,352 minuta.



Slika 29. GPC hromatogrami CMD (A) i AgNPs-CMD (B)



U cilju definisanja srednjih molarnih masa polaznog CMD i AgNPs-CMD, ili njihovih frakcija, konstruisana je kalibraciona kriva  $M_w = f(t_r)$  na osnovu definisanih standarda. Funkcija zavisnosti molarnih masa standarda i retencionog vremena prikazana je jednačinom (9):

$$M_w = 313\,724 - 61\,608 \cdot t_r \quad (9)$$

Korišćenjem jednačine (9) definisana je srednja molarna masa ispitivanih frakcija polaznog CMD i AgNPs-CMD, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 11.

**Tabela 11.** GPC parametri i molarne mase CMD i AgNPs-CMD

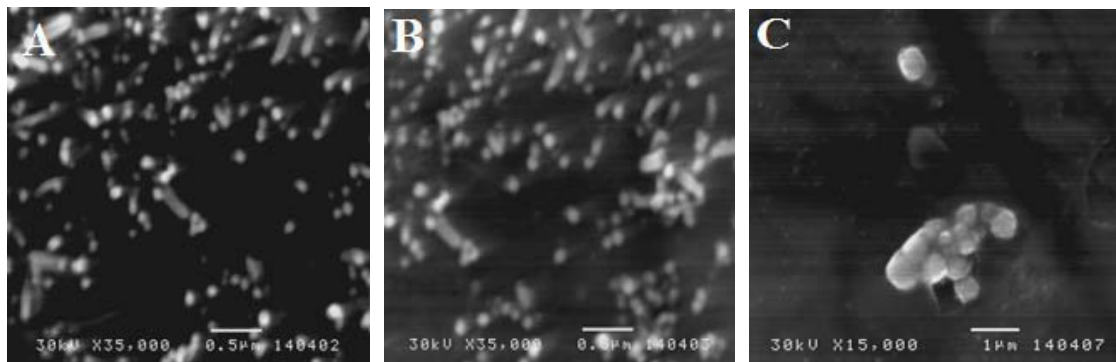
	<b>Retenciono vreme, <math>t_r</math> (min)</b>	<b>Molarna masa, <math>M_w</math> (g/mol)</b>
<b>AgNPs-CMD</b>	3,255	113 191
<b>CMD</b>	3,695	86 083
	3,352	107 216

Analizom molarnih masa odgovarajućih frakcija CMD i AgNPs-CMD može se zaključiti da u sintezi AgNPs-CMD učestvuje frakcija CMD srednje molarne mase 107 216 g/mol. Ovi manji oligomeri CMD, zajedno sa drugom frakcijom, predstavljaju optimalni ligand za kompleksiranje sa Ag, dajući AgNPs-CMD srednje molarne mase 113 191 g/mol.

### 4.3.3. SEM mikroskopija

Radi dalje morfološke analize, primenjene su metode SEM analize sa energijom elektronskog mlaza od 30 keV. SEM mikrografi prikazuju pojedinačne AgNPs čestice, kao i veće agregate (v. Sl. 30). Kao što se može uočiti, dominiraju sferne čestice veličine 10-60 nm (v. Sl. 30A i 30B). SEM mikrografi pokazuju da su nanočestice stabilne i nisu u direktnom kontaktu, iako su primećeni i pojedinačni agregati. Ovo se može pripisati stabilizaciji nanočestica od strane CMD, kao stabilizirajućeg agensa. Radi ilustracije i poređenja na Slici 30C prikazan je i

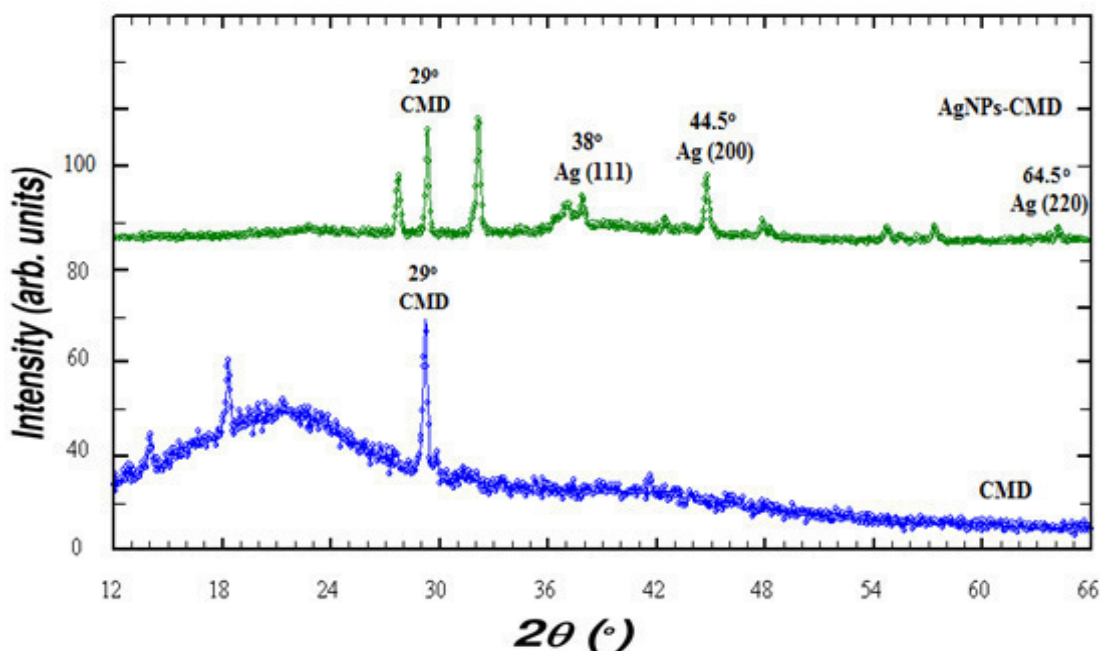
mikrograf uočenog agregata nanočestica, nepravilne strukture, bez dobro definisane morfologije, ali formiran od više pojedinačnih čestica sfernog oblika.



**Slika 30.** Skenirajući elektronski mikrografi AgNPs-CMD čestica (A, B) i agregata (C)

#### 4.3.4. Difrakcija X-zraka (XRD)

Metoda difrakcije X-zraka primenjena je radi definisanja prostorne kristalne rešetke. Dobijeni XRD difraktogrami su prikazani na Slici 31. Na osnovu literaturnih podataka, XRD pikovi sa vrednošću približno oko  $38^\circ$ ,  $44^\circ$  i  $64^\circ$  mogu biti prepoznati kao 111, 200 i 220 kristalografske ravni površinski centrirani kubnih Ag kristala, respektivno (Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013). XRD profil AgNPs-CMD (v. Sl. 31) pokazuje  $2\theta$  pikove na  $38^\circ$ ,  $44.5^\circ$  i  $64.5^\circ$  koji se odnose na AgNPs, dok se pik na  $29^\circ$  odnosi na CMD koji je prisutan i u difraktogramu CMD, koji se razlikuje od onog AgNPs-CMD prema očekivanju jer je u pitanju amorfna forma pa je otuda i broj pikova značajno manji u odnosu na kristalnu formu čestica. Ovi rezultati dodatno potvrđuju postojanje AgNPs u finalnom proizvodu AgNPs-CMD. Slični rezultati primećeni su za AgNPs sintetizovanih sa dekstranom, pululanom (Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013), ekstrakt od kokosovog otpadaka, Cts, Cts / želatin i želatina BNCs, i CMC (Ahmad i sar., 2011; Tolmachev i sar., 1985).

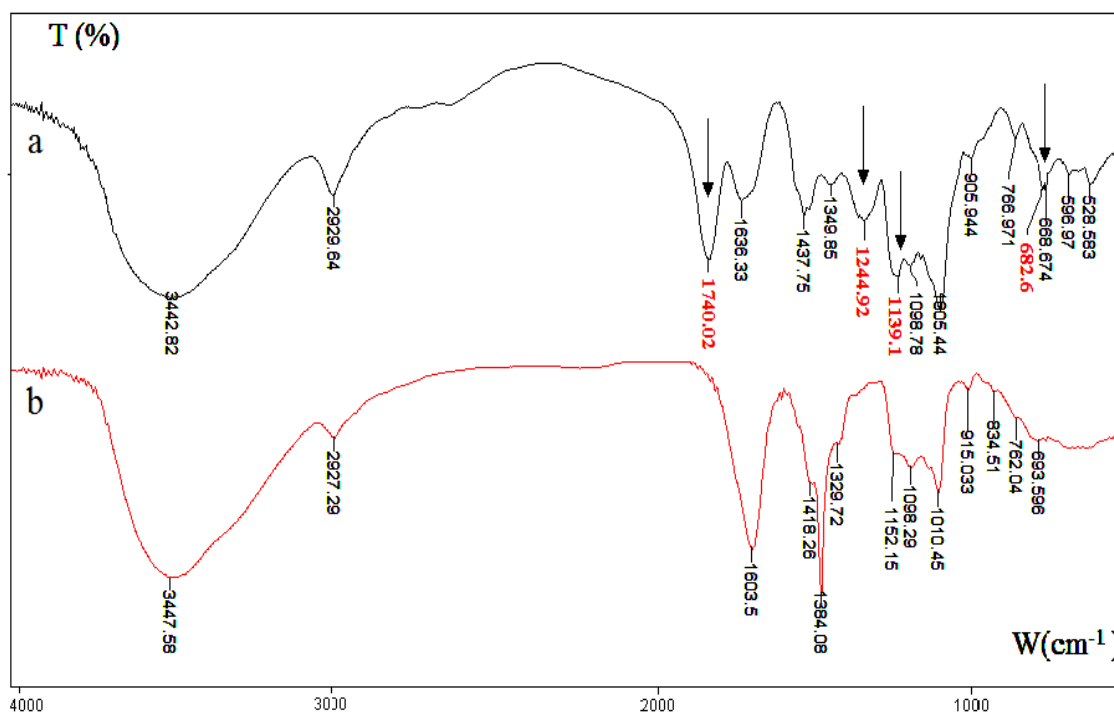


Slika 31. XRD difraktogrami CMD i AgNPs-CMD

#### 4.3.5. FTIR spektroskopija

Proces sinteze i karakterizacije AgNPs praćen je na osnovu spektar strukturnih korelacija metodom FTIR spektroskopije. Asignacija spektara vršena je na empirijski način, tako što su upoređivani spektri polaznog CMD i AgNPs-CMD, kao i na osnovu dostupnih literaturnih podataka o spektrima sličnih sistema. FTIR spektar CMD analiziran je ranije. Za spektar strukturne korelacije najvažnija je oblast vibracija svih tipova karboksilne grupe i upoređivanje sa izgledom spektra u ovoj oblasti sa onom kod AgNPs-CMD. U FTIR spektru CMD koji je prikazan na Slici 32a, postoje intenzivne trake na oko: 1740, 1244, 1139 i 682  $\text{cm}^{-1}$  (ove su u spektru označene strelicom) koje potiču od valentine  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ,  $\delta(\text{C}-\text{OH})$ ,  $(\text{C}-\text{O})$  i  $\delta(\text{C}=\text{O})$  vibracija, respektivno. Traka od valentine  $\nu(\text{C}=\text{O})$  nađena je kod sličnih AgNPs sa različitim karboksimetil polisaharidima: kod karagenana 1737  $\text{cm}^{-1}$ , karboksimetil celuloze (Daniel-da-Silva i sar., 2009), kod karboksimetilovanih glukana 1736  $\text{cm}^{-1}$  (Bao i sar., 2002), a u spektru CMD na 1750  $\text{cm}^{-1}$  (Prinz i sar., 2010). Kao što se može videti sa Slike 32a, spektar korišćenog CMD ima karakteristične trake na 1740  $\text{cm}^{-1}$ , a sem nje i one na 1244  $\text{cm}^{-1}$ , 1139  $\text{cm}^{-1}$  i 682  $\text{cm}^{-1}$ , koje se mogu pripisati svim tipovima vibracija CO karboksimetil grupe. Međusobno upoređivanje izgleda spektra u oblasti vibracija CO grupa može da bude

dobar pokazatelj o uspešnosti sinteze, ali i o eventualnim interakcijama između AgNPs i CMD. Negativno naelektrisane karboksilne grupe su u elektrostatičkoj interakciji sa  $\text{Ag}^+$  jonima, kako smo ranije zaključili, tako da mogu pored redukcije da formiraju i kompleks kao deo Ag nanostrukture (Abdel-Mohsen i sar., 2012). Naime, ako se vrši redukcija i vezivanje deprotonovanjem OH grupe iz karboksilne grupe, u spektru AgNPs-CMD ne očekuje se deformaciona traka  $\delta(\text{C-OH})$ , a položaj  $\nu(\text{C-O})$  trake treba da bude promenjen. Ukoliko bi se vršila samo redukcija, deprotonovanjem, onda bi se očekivale promene u svim oblastima spektra u kojima se očekuju vibracije svih tipova OH grupe, koje su uključene u obrazovanje vodničnih veza, tj. pomeranje ka višim frekvencijama valentne OH vibracije i promene u obliku traka koje se uočavaju u spektru, a umesto karboksilatne grupe bi se očekivale trake od vibracija karboksilatnog anjona. Ako je koordinacija moguća putem elektronskog para  $\text{C=O}$  grupe sa Ag (koordinacija veza između dekstrana i AgNPs), očekuje se smanjenje frekvencije valentne  $\text{C=O}$  vibracije. U ovom slučaju, tačan položaj traka valentnih  $\text{C=O}$  i  $\text{CO}$  vibracija pretežno zavisi od interakcije između Ag i dva O atoma iz  $-\text{COOR}$  grupa. U slučaju karboksilatnog anjona, usled delokalizacije elektrona, red dve  $\text{CO}$  veze je potpuno izjednačen, tako da se u oblasti valentne  $\text{CO}$  vibracije očekuju dve trake (jedna na oko  $1600\text{ cm}^{-1}$ , a druga na oko  $1400\text{ cm}^{-1}$ ), od asimetrične i simetrične  $\text{CO}$  vibracije, respektivno (Garza-Navarro i sar., 2013; Daniel-da-Silva i sar., 2009). Kao što se može videti, u FTIR spektru AgNPs-CMD nema trake od  $\delta(\text{C-OH})$  vibracije na  $1244\text{ cm}^{-1}$  i od  $\nu(\text{C-O})$  na  $1139\text{ cm}^{-1}$ , nema traka od deformacione  $\delta(\text{C=O})$  vibracije na oko  $680\text{ cm}^{-1}$ , dok se traka od  $\nu(\text{C=O})$  pomera ka nižim vrednostima (na oko  $1603\text{ cm}^{-1}$ ) što sve ukazuje na promenjenu elektronsku gustinu unutar karboksilatne grupe pre i nakon sinteze AgNPs. U prilog ovakvom zaključku je i činjenica da u spektru AgNPs-CMD postoji traka na oko  $1420\text{ cm}^{-1}$  koje nema u spektru CMD.



Slika 32. FTIR spektri CMD (a) i AgNPs-CMD (b)

Imajući u vidu napred iznesene zaključke, a na osnovu položaja, intenziteta, kao i literaturnih podataka, trake na oko 1603 i 1420  $\text{cm}^{-1}$  mogu se pripisati asimetričnoj i simetričnoj CO vibraciji (Garza-Navarro i sar., 2013; Daniel-da-Silva i sar., 2009), respektivno. Ova činjenica ukazuje na to da postoji jaka interakcija između Ag i dva O atoma iz  $-\text{COO}^-$  grupe, tj. na koordinaciju jona srebra sa karboksilnom grupom, kao što je opisano kod sličnih kompleksa (Abdel-Mohsen i sar., 2012).

Pored toga, FTIR spektar AgNPs-CMD (v. Sl. 32b) pokazuje traku na 1384  $\text{cm}^{-1}$ . Poreklo ove trake u spektru je doskora bilo nejasno. Prema nekim autorima ova traka je karakteristična za sintetisane AgNPs i potiče od interakcija (sternih) AgNPs sa redukujućim i zaštitnim agensom, dok prema drugima ona može biti pripisana simetričnoj valentnoj vibraciji O-N-O veze, karakteristične za nitratne radikale ( $\text{O}=\text{NO}_2^-$ ), (Kanmani i Lim, 2013; Ahmad i sar., 2011; Garza-Navarro i sar., 2013). Sve ovo sugerise na formiranje neorganske soli između natrijum katjona, koji su raseljeni od svog prirodnog položaja od  $\text{R-CH}_2\text{OCOO}^-$  grupa kod CMC, i one od nitratnih anjona iz  $\text{AgNO}_3$  reagensa korišćenog pri sintezi nanočestica (Garza-Navarro i sar., 2013). U radu (Glišić i sar., 2015) je pretpostavljeno da ova traka potiče od

valentne vibracije nitratnih jona koji su adsorbovani na površini AgNPs-CMD zaostalog srebra nitrata ili koordinirana sa Ag jonima.

Kako se sinteza čestica vrši u slabo alkalnoj sredini i temperaturi ključanja reakcione smeše, radi utvrđivanja eventualnih promena u strukturi CMD analizirana je nižefrekventna oblast FTIR spektra ( $1000-700\text{ cm}^{-1}$ ). Naime, u ovoj oblasti, kako je ranije navedeno, očekuju se trake deformacionih CH vibracija od CMD. Broj i tačan položaj traka u ovoj oblasti zavisi od uzajamnog delovanja CH grupa (Panov i Zhbankov, 1976; Zhbankov, 1972; Panov i Zhbankov, 1988), tj. konformacije glukopiranoznog prstena. Prisustvo traka na oko  $915$ ,  $834$  i  $762\text{ cm}^{-1}$  u spektru AgNPs-CMD ukazuje na  ${}^4C_1$  konformaciju  $\alpha$ -D-glukopiranoznog prstena, kao i kod polaznog CMD.

#### 4.3.6. Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-CMD

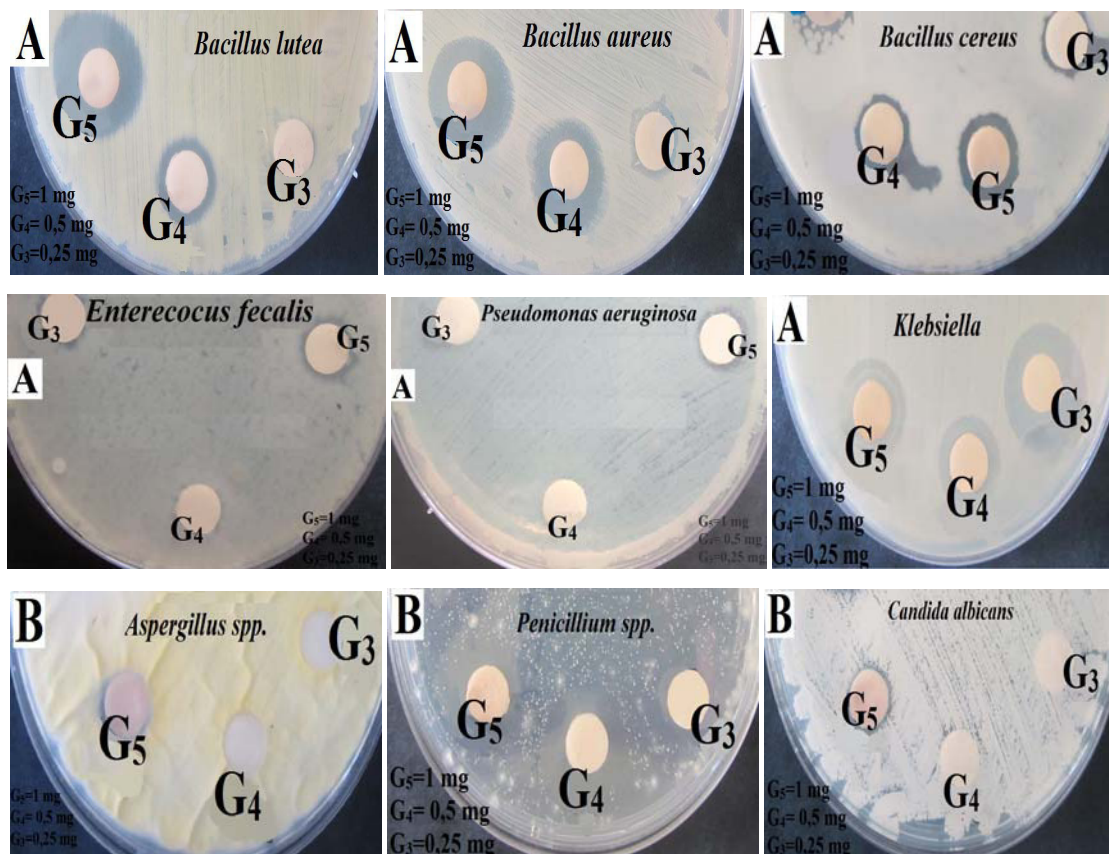
Veliki broj literaturnih podataka pokazuje da AgNPs poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost koja se objašnjava akumulacijom jona srebra iz rastvora u bakterijskim membranama koje mogu dovesti do smrti ćelije (Delić, 2011). Naime, katjon srebra može da reaguje sa tiolnim grupama i proteinima u ćelijama, a sem toga može inaktivirati enzime koji su potrebni za normalan ćelijski metabolizam (Sondi i Salopek, 2004).

Antimikrobna aktivnost stabilizovanih AgNPs-CMD rađena je disk-difuzionom metodom na agaru. Za testove antimikrobne aktivnosti sintetisanih AgNPs-CMD korišćeni su klinički izolati bakterijskih patogena (*B. lutea*, *B. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella*) i gljivičnih sojeva (*Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, i *C. albicans*) kao indikatori sojeva za analizu. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti rastvora AgNPs-CMD nanočestica prikazani su u Tabeli 12. Radijalni rast zone inhibicije povećava se sa povećanjem koncentracije AgNPs-CMD od  $0,25$  do  $1\text{ mg/ml}$  izuzev sojeva *Enterococcus faecalis* kod kojih se zona inhibicije postiže tek kod koncentracije AgNPs-CMD od  $1\text{ mg/ml}$ . Gljivica *Penicillium spp* je osetljivija na AgNPs-CMD u odnosu na druga dva ispitivana gljivična soja kod kojih se zona inhibicije od oko  $11\text{ mm}$  postiže kod koncentracije AgNPs-CMD od  $1\text{ mg/ml}$ . AgNPs-CMD nanočestice su pokazale najveću aktivnost na bakterije *B. lutea* i *B. aureus*. Antifungalna aktivnost AgNPs-CMD analizirana je prema soju *C. albicans*. Zone inhibicije prema *C. albicans* su veoma male.

**Tabela 12.** Radijalni prečnik inhibicije zona ispitivanih bakterijskih i gljivičnih sojeva

Radijalni prečnik inhibicije (mm)				
AgNPs-CMD				
		G <sub>3</sub> = 0,25 mg/ml	G <sub>4</sub> = 0,5 mg/ml	G <sub>5</sub> = 1 mg/ml
Bakterijski sojevi	<i>Bacillus lutea</i>	11	13	20
	<i>Bacillus aureus</i>	12	18	21
	<i>Bacillus cereus</i>	11	12	14
	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	11
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	12
	<i>Klebsiella</i>	13	14	15
Gljivični sojevi	<i>Aspergillus spp.</i>	-	-	11,5
	<i>Penicillium spp.</i>	13	20	20
	<i>Candida albicans</i>	-	-	11

Zona inhibicije *B. lutea*, *B. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* bile su 20, 21, 14, 11, 12 i 15 mm, respektivno. AgNPs-CMD u koncentraciji od 1 mg/ml pokazali su niz specifičnosti prema svojoj antimikrobnoj aktivnosti (v. Sl. 33A).



**Slika 33.** Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-CMD različite koncentracije protiv bakterijskih sojeva (*B. lutea*, *B. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *Klebsiella*) (A) i gljivičnih sojeva (*Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* i *C. albicans*) (B)

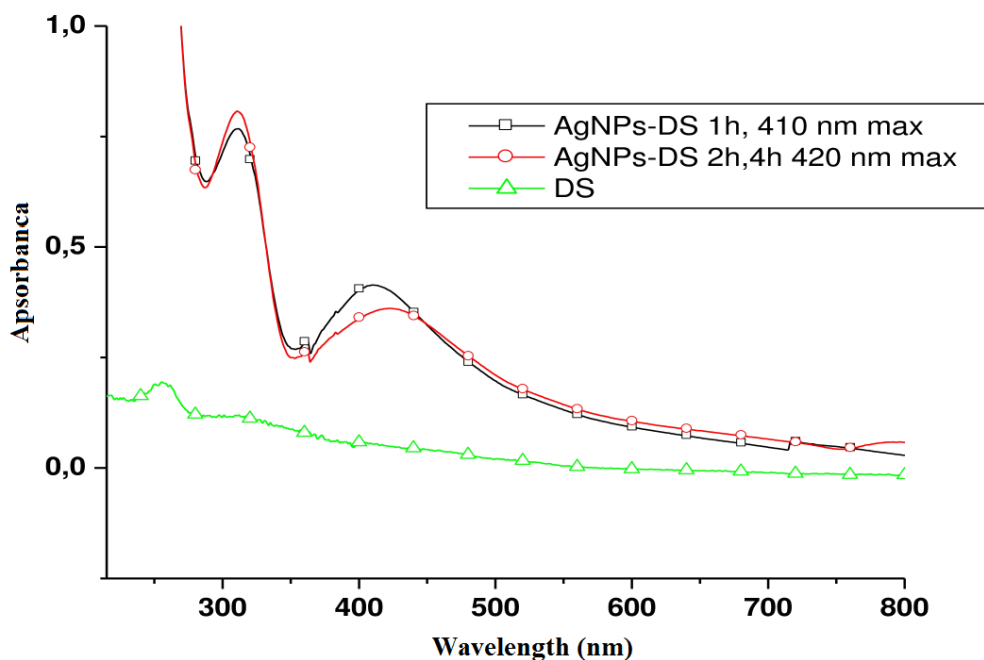
#### 4.4. Nanočestice AgNPs-DS

##### 4.4.1. UV-Vis spektrofotometrija

I u slučaju sinteze AgNPs-DS uspešnost sinteze AgNPs je preliminarno potvrđena promenom boje reakcionog sistema iz bezbojne do žućkasto-braon i analizom UV-Vis spektra, kako je ranije diskutovano (Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013; Wei i sar., 2009; Tran i sar., 2010; Quelemes i sar., 2013; Hamedi i sar., 2012; Garza-Navarro i sar., 2013; Ahmad i sar., 2011; Prinz i sar., 2010; Abdel-Mohsen i sar., 2012). UV-Vis spektri DS, kao i AgNPs-DS uzoraka sintetisanih na temperaturi ključanja posle 1 i 2 časa sinteze prikazani su na Slici 34. Kao što se to može videti, u vidljivom delu spektra AgNPs-DS postoji široka intenzivna traka



u oblasti oko 420 nm, koja je rezultat SPR prelaza, što ukazuje na formiranje AgNPs-DS. Položaj ove apsorpcione trake promenio se sa 410 nm (1 čas nakon sinteze) na 420 nm (2 časa nakon sinteze) i nije bilo dodatnih promena u vremenu od 4 časa nakon sinteze, niti stajanjem u toku tri meseca, što ukazuje na to da se sinteza završava posle 2 časa s jedne, a s druge strane na agregativnu stabilnost. Prema podacima iz literature, procenjena veličina AgNPs-DS na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma bila bi oko 40 nm (Magudapatty i sar., 2001).



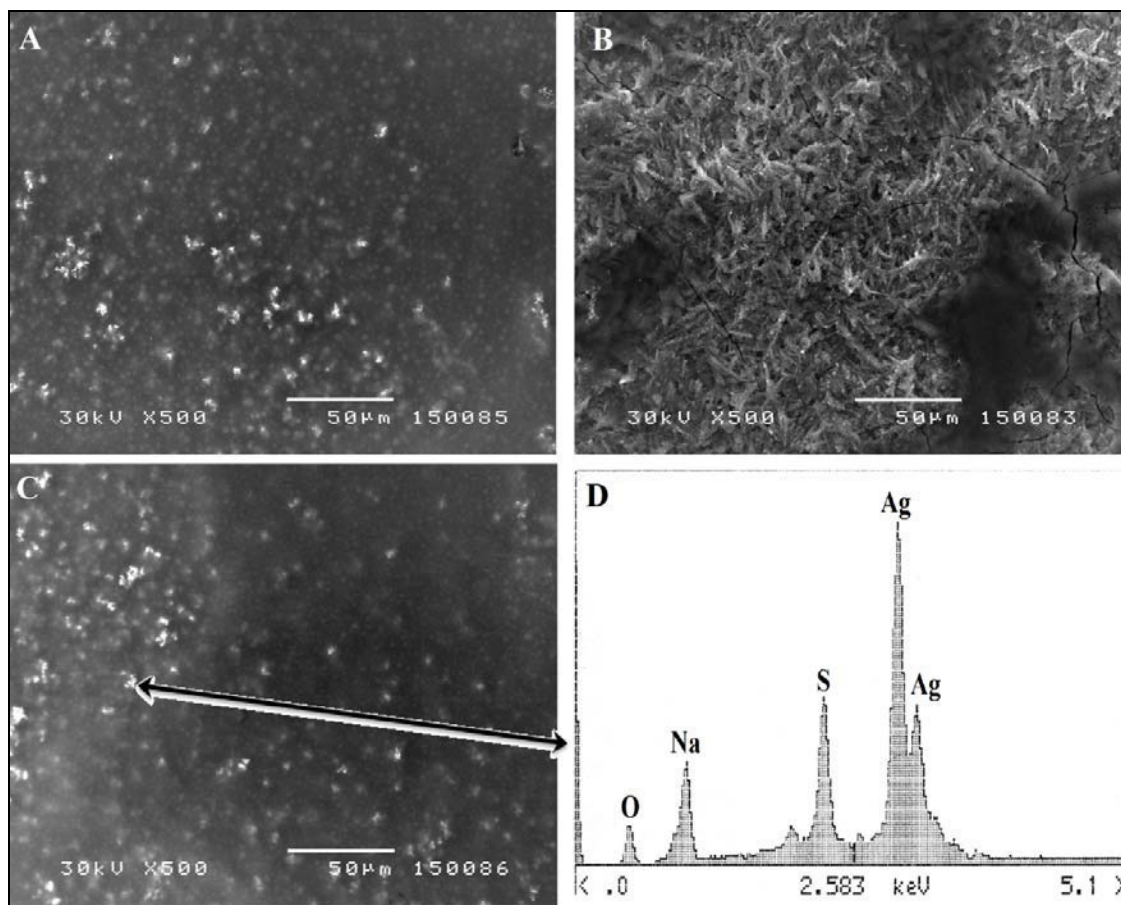
Slika 34. UV-Vis spektri AgNPs-DS i DS

U UV-Vis spektru AgNPs-DS postoji i traka na oko 320 nm koje nema u spektru polaznog DS. Ova traka je, najverovatnije, rezultat  $n-\pi$  prelaza sulfo grupe, čija je elektronska gustina promenjena usled interakcija sa srebrom, pa može služiti ako kriterijum uspešnosti sinteze.

#### 4.4.2. SEM mikroskopija

Morfologija sintetisanih AgNPs čestica je okarakterisana SEM analizom. SEM mikrografi dijeliziranih uzoraka prikazuju pojedinačne AgNPs čestice, kao i veće agregate (v. Sl. 35). Kao što se može uočiti, dominiraju sferne čestice veličine 10-60 nm (v. Sl. 35A i 35C), ali je

uočena i pojava agregata. SEM mikrografi pokazuju da su nanočestice stabilne i nisu u direktnom kontaktu. Ovo se može pripisati stabilizaciji nanočestica od strane DS, kao stabilizirajućeg agensa. Mikrograf nedijaliziranog uzorka pokazuje prisustvo čestica nepravilne strukture, bez dobro definisane morfologije, usled kristalizacije liganda (v. Sl. 35B).



**Slika 35.** SEM slike AgNPs-DS dijaliziranog uzorka koji pokazuje postojanje agregata nanočestica (A i C), velikih čestica kod nedijaliziranog uzorka (B) i tipičan primer EDX spektra pojedinih AgNPs-DS dijaliziranog uzorka (D)

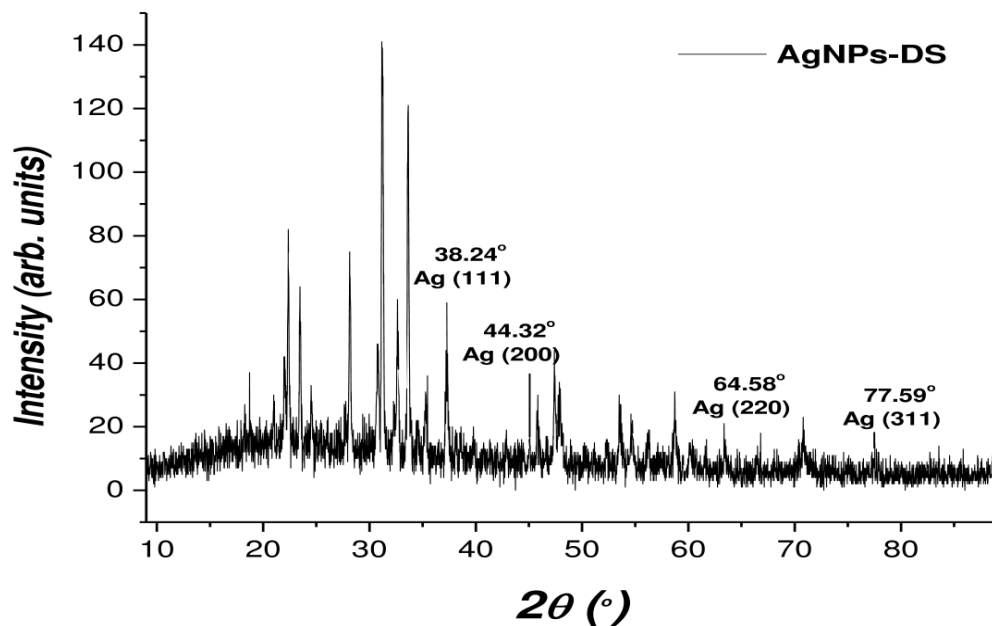
#### 4.4.3. EDX analiza

Metoda EDX može se koristiti i za kvalitativno i kvantitativno određivanje srebra uključenog u formiranje AgNPs (Clearfield i sar., 2008). Tipičan EDX spektar dobijen iz oblasti pojedinačnih AgNPs-DS prikazan je na Slici 35D za česticu označenu strelicom. Snažan

signal koji odgovara elementarnom srebru na oko 3 eV i slabijim signalima koji odgovara S, Na i O (iz Na soli DS) potvrdili su formiranje AgNPs kao deo AgNPs-DS. Ovo je u skladu sa pojavom optičkog apsorpcionog pika na otprilike 3 eV (410 nm) poreklom iz površinske plazmonske rezonance koja je tipična za nanokristale metala srebra (Bankura i sar., 2012; Nikolić i sar., 2014).

#### 4.4.4. Difrakcija X-zraka (XRD)

XRD difraktogrami su prikazani na Slici 36. Na osnovu literaturnih podataka, XRD pikovi sa vrednošću približno oko 38°, 44°, 64°, 77° i 81° mogu biti prepoznati kao 111, 200, 220, 311 i 222 kristalografske ravni površinski centrirani kubnih Ag kristala, respektivno (Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013). XRD profil AgNPs-DS (v. Sl. 36) pokazuje pikove na 38.24°, 44.32°, 64.58°, 77.59° i 81.75° koji se odnose na AgNPs. Ovi rezultati dodatno potvrđuju postojanje AgNPs u finalnom proizvodu AgNPs-DS. Slični rezultati primećeni su za AgNPs sintetizovanih sa dekstranom, pululanom (Bankura i sar., 2012; Kanmani i Lim, 2013), ekstrakt od kokosovog otpadaka, Cts, Cts / želatin i želatina BNCs, i CMC (Garza-Navarro i sar., 2013; Ahmad i sar., 2011).



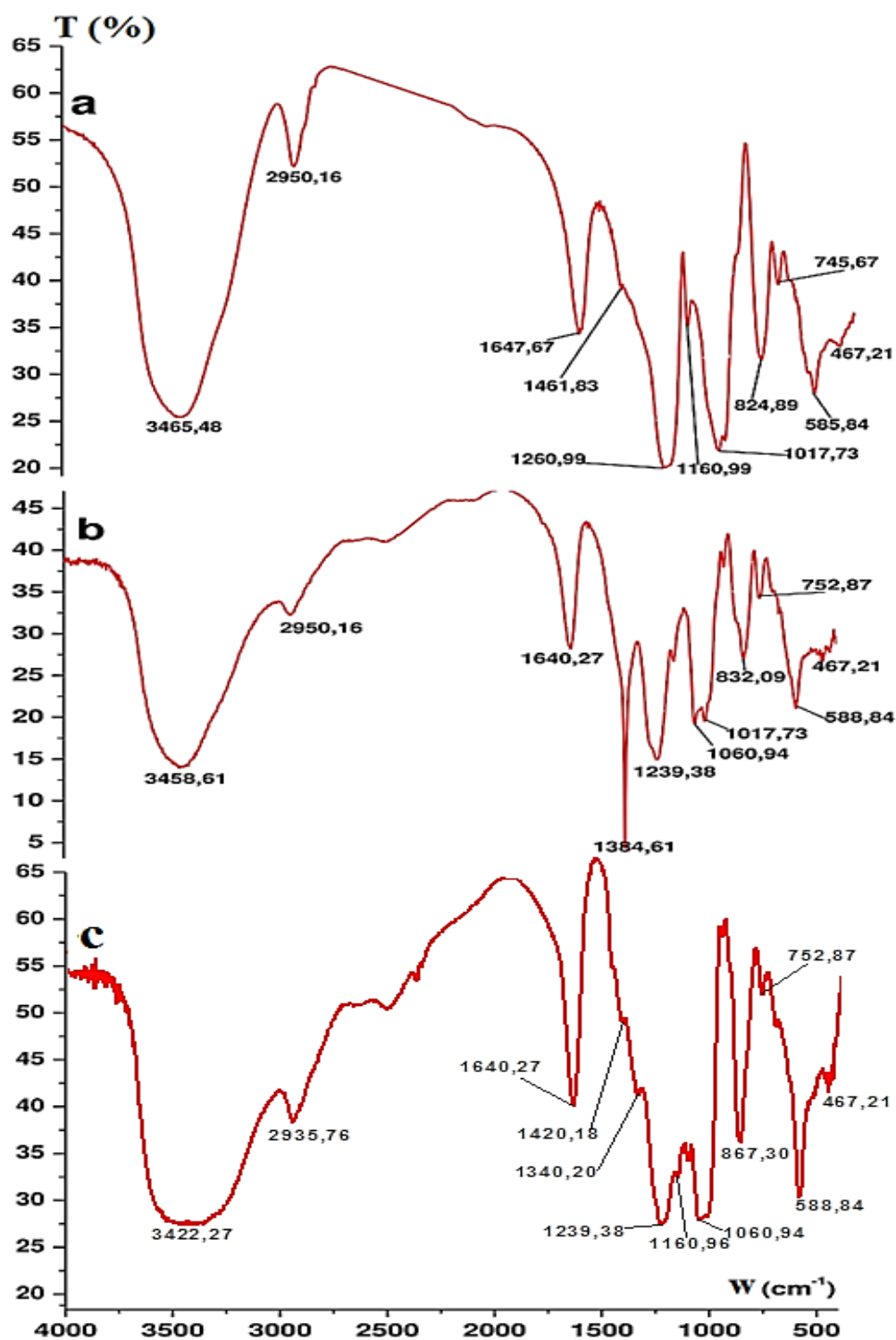
Slika 36. XRD difraktogrami AgNPs-DS

Prosečna veličina AgNPs procenjena je iz širine refleksije u rentgenskom snimku koja omogućava izračunavanje veličine čestica prema Scherrerovoj jednačini (7) kako je ranije detaljnije prikazano. U ovom slučaju određivanje je veličine AgNPs vršeno je na Braggovoj refleksiji na  $38.24^\circ 2\theta$ , što daje srednju veličinu kristalita od  $40 \pm 4$  nm što je u skladu sa rezultatima dobijenim prethodnim metodama.

#### 4.4.5. FTIR spektroskopija

Analiza infracrvenih spektara izvedena je na empirijski način upoređivanjem spektra DS i AgNPs-DS i podataka iz literature (Quelemes i sar., 2013; Glišić i sar., 2015). FTIR spektri, natrijumove soli dekstran sulfata, AgNPs-DS pre i nakon dijalize prikazani su na Slici 37. Sličnost spektara DS i njegovih AgNPs govori u prilog slične pretežno jonske prirode ovih jedinjenja. U FTIR spektru DS, prisustvo sulfo grupe može se odrediti prisustvom apsorpcionih traka o kojima je ranije bilo više reči. FTIR spektar AgNPs-DS u osnovi je sličan spektru početnog DS. Razlike postoje u položaju trake koji potiče od  $\nu_{\text{as}}(\text{S}=\text{O})$  koja se pojavljuje na oko  $1239 \text{ cm}^{-1}$  u spektru nedijaliziranog i dijaliziranog AgNPs-DS, dok se u spektru DS nalazi na oko  $1261 \text{ cm}^{-1}$ , dakle između njih postoji razlika od  $22 \text{ cm}^{-1}$ . Istovremeno razlika između položaja trake od  $\nu_{\text{as}}(\text{O}-\text{S}-\text{O})$  vibracije između DS i nedijaliziranog AgNPs (kod njega je položaj viši,  $832 \text{ cm}^{-1}$ ) iznosi oko  $10 \text{ cm}^{-1}$ . Razlika u položaju ove trake u odnosu na spektar dijaliziranog AgNPs-DS nešto je veća i iznosi oko  $45 \text{ cm}^{-1}$ . Ove činjenice ukazuju na snažnu interakciju sulfo grupa sa srebrom, s jedne strane i verovatno, na promenu konformacije sulfo grupe od ekvatorijalne do aksijalne pozicije s druge strane.

Interesantna je činjenica, da FTIR spektar nedijaliziranog uzorka AgNPs-DS (v. Sl. 37b) sadrži traku na  $1384 \text{ cm}^{-1}$ , a ne i spektar dijaliziranog uzorka (v. Sl. 37c). Poreklo ove trake je razmatrano na strani 97. Da bi se razjasnilo poreklo ove trake u slučaju AgNPs-DS i AgNPs-E (o kojima će biti više reči kasnije), reakciona smeša je dijalizirana do negativne reakcije na  $\text{Ag}^+$  jon i nitrate, a potom su snimani spektri. U ovako prečišćenom uzorku AgNPs-DS nema ove trake, pa je lako zaključiti da ona potiče od zaostalih nitratnih jona.



Slika 37. FTIR spektri natrijumove soli dekstran sulfata (DS) (a), AgNPs-DS pre (b) i nakon dijalize (c)

Spektralna oblast od 1000 do 700  $\text{cm}^{-1}$ , gde se pojavljuju trake koje su rezultat deformacionih CH vibracija van ravni, kao i valentnih CCO, OCO i COC vibracija, važna je za utvrđivanje konformacije glukopiranozne jedinice kako je ranije više puta navedeno. Naime, prisustvo traka na oko 915  $\text{cm}^{-1}$  (slaba traka), 850  $\text{cm}^{-1}$  i 752  $\text{cm}^{-1}$  u oba FTIR spektara ukazuje na  $^4\text{C}_1$  konformaciju  $\alpha$ -D-glukopiranoznog prstena, što znači da konformacija u toku sinteze ostaje nepromenjena.

Pojava traka u oblasti vibracija svih tipova vode (valentna HOH, 3400  $\text{cm}^{-1}$  kao i deformaciona HOH oko 1640  $\text{cm}^{-1}$ ) u sva tri spektra ukazuje na prisustvo konstitucione vode u strukturi.

#### 4.4.6. Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-DS

Rastvor AgNPs-DS pokazao je antimikrobnu aktivnost protiv bakterija, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus luteus in haus strain*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, što dokazuje prisustvo jasnih zona inhibicije rasta bakterija oko diskova.

**Tabela 13.** Radijalni prečnik zona inhibicije za testirane bakterijske i gljivične sojeve

Radijalni prečnik zona inhibicije (mm)					
AgNPs-DS					
			<b>G<sub>1</sub> = 0,25 mg/ml</b>	<b>G<sub>2</sub> = 0,5 mg/ml</b>	<b>G<sub>3</sub> = 1 mg/ml</b>
Bakterijski sojevi	Gram pozitivne	<i>Staphylococcus aureus</i>	17	18	19
		<i>Bacillus cereus</i>	16	18	19
		<i>Bacillus luteus in haus strain</i>	20	21	24
		<i>Bacillus subtilis</i>	16	17	19
		<i>Listeria monocytogenes</i>	16	17	18
	Gram negativne	<i>Escherichia coli</i>	17	18	21
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	24	26
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	18	19
		<i>Proteus vulgaris</i>	13	14	15
Gljivični soj		<i>Candida albicans</i>	-	16	-

Radijalni prečnici zona inhibicije prikazani su u Tabeli 13. Inhibicija je primećena kod svih analiziranih bakterijskih sojeva sa koncentracijom 0,25 mg/ml AgNPs-DS, što ukazuje na to da je minimalna inhibitorna koncentracija na ove mikroorganizme niska. Na primer, u literaturi (Dhand i sar., 2016) je navedeno da su minimalne inhibitorne koncentracije za *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* bile oko 0,26 mg/l. Najviše zone inhibicije su zabeležene protiv *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus luteus in haus strain*. Zona inhibicije protiv ovih mikroorganizama za koncentraciju od 1 mg/ml AgNPs-DS bila je 26 i 24 mm, respektivno. Među bakterijskim sojevima, *Proteus vulgaris* najmanje je bio osetljiv na aktivnost AgNPs-DS sa zonom inhibicije 15 mm, kada je korišćena koncentracija 1 mg/ml AgNPs-DS. Ispitivanje aktivnosti različite koncentracije AgNPs-DS u odnosu na sve druge korišćene bakterijske sojeve pokazale su slične rezultate sa zonama inhibicije u opsegu 16-17 mm, 18-19 mm i 18-21 mm za koncentraciju od 0.25, 0.5 i 1 mg/ml AgNPs-DS. Rezultati za *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus luteus in haus strain* i *Pseudomonas aeruginosa* veći su od prethodno prikazanih za AgNPs-CMD (Glišić i sar., 2015). Antimikrobna aktivnost protiv *Candida albicans* primećena je samo uz koncentraciju od 0,5 mg/ml AgNPs-DS. Niska antimikrobna aktivnost AgNPs protiv *Candida albicans* već je navedena za AgNPs stabilizovane CMD (Glišić i sar., 2015). Mehanizam antimikrobne aktivnosti AgNPs može se objasniti akumulacijom srebra u bakterijskim membranama koje mogu dovesti do smrti ćelije (Boxall i sar., 2007). Rastvoren Ag katjon može da reaguje sa tiolnim grupama i proteinima u ćelijama. Dodatno može inaktivirati enzime koji su potrebni za normalan ćelijski metabolizam (Klaine i sar., 2008).

AgNPs-DS u koncentraciji od 1 mg/ml pokazale su niz specifičnosti prema antimikrobnoj aktivnosti. Ali veća koncentracija srebra može biti štetna i za mikrobe. Zbog toga su manje koncentracije mnogo primenljive u tu svrhu. Niže efektivne koncentracije AgNPs, koje izazivaju efekat na organizme različite od kontrole, kreću se od nekoliko ng/l do desetina mg/l u zavisnosti od organizma i mnogih drugih faktora (Moreno-Garrido i sar., 2015). Ovaj dizajn sinteze nanočestice srebra ima veliki potencijal zbog svoje antimikrobne aktivnosti.

## 4.5. Nanočestice AgNPs-E

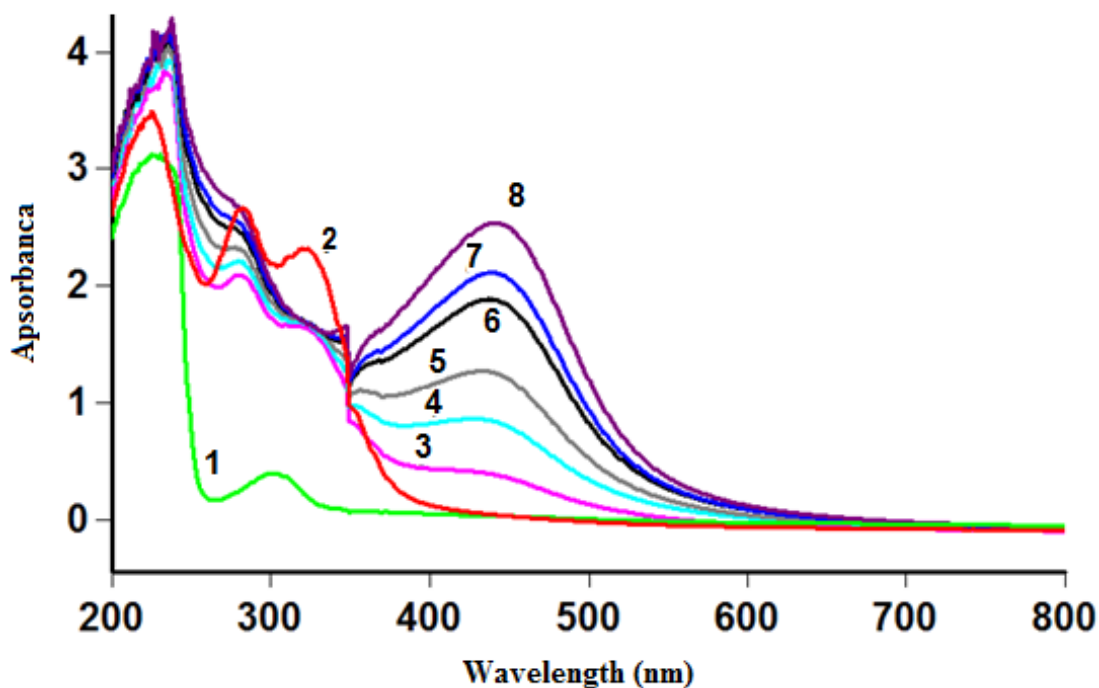
### 4.5.1. UV-Vis spektrofotometrija

Kod dva prethodna postupka sinteze AgNPs korišćeni su netoksični agensi. Zeleni postupci sinteze sa vodenim ekstraktima dobijeni iz prirodnih proizvoda, kao što je ranije napomenuto, imaju niz ekoloških prednosti. Sem toga s obzirom na kompleksan sastav ekstrakata koji i sami poseduju redukujuće i stabilizirajuće osobine, ali i antimikrobnu aktivnost, bilo je interesantno sintetizovati AgNPs sa ekstraktom dimnjače, o čemu nema dostupnih podataka u literaturi i korelirati rezultate sa onima koji se odnose na CMD i DS sintezu. I u ovom slučaju je formiranje AgNPs-E praćeno promenom boje reakcione smeše od bezbojne do žućkasto-braon. Međutim, sinteza je izvršena na sobnoj temperaturi i na temperaturi ključanja reakcione smeše. Kao što je poznato iz literaturnih podataka (Amooaghaie i sar., 2015; Sathishkumar i sar., 2009; Bar i sar., 2009; MubarakAli i sar., 2011; Vilchis-Nestor i sar., 2008; Shankar i sar., 2004; Abu Bakar i sar., 2007; Vigneshwaran i sar., 2006; Chandran i sar., 2006; de Aragão i sar., 2016; Ebrahiminezhad i sar., 2016; Huang i sar., 2007; Sabri i sar., 2016; Bednar, 2014), metode UV-Vis spektrofotometrije su korišćene za praćenje toka sinteze AgNPs-E, njihove količine, veličine čestica i agregacione stabilnosti. Naime, kada se  $\text{Ag}^+$  redukuje do  $\text{Ag}^0$  ima trend da formira klastere ili da se aglomeriše, što je praćeno batohromnim pomeranjem apsorpcionog maksimuma. Prisustvo fitohemijskih jedinjenja u reakcionoj smeši, pored redukujućeg efekta ima i inhibitorni efekat na rast AgNPs-E. Postojanje SPR trake u oblasti od 380 do 450 nm ukazuje na formiranje AgNPs-E. Povećanje intenziteta ove trake je proporcionalno sa količinom čestica, a na osnovu tačnog položaja može se odrediti i njihova veličina (Bednar, 2014). UV-Vis spektri ispitivanih uzoraka snimljenih kao funkcija reakcione temperature (sobna temperatura i temperatura ključanja) i vremena prikazani su na Slici 38 i Slici 39, a date su i vrednosti  $\lambda_{\text{max}}$ .

U UV-Vis spektrima snimljenih na sobnoj temperaturi postoji traka od SPR prelaza oko 436 nm, čiji se položaj pomera do 438 nm sa povećanjem vremena sinteze do 90 minuta, a ujedno njen intenzitet raste, što ukazuje na povećanje koncentracije AgNPs-E. Ove činjenice potvrđuju formiranje AgNPs-E s jedne, a s druge strane da se maksimalna koncentracija postiže posle 90 minuta. Sa produženjem vremena sinteze do 90 minuta dolazi do formiranja čestica većih razmera. Na osnovu relacije (Bednar, 2014) procenjena veličina čestica iznosi

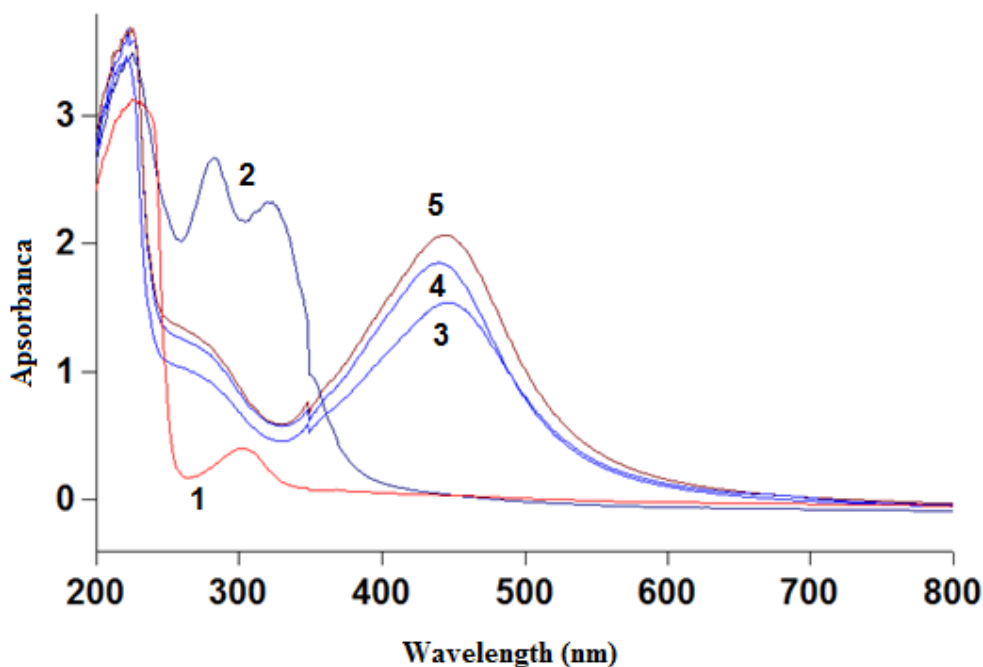


oko 20 nm. Posle 15 dana stajanja, položaj trake praktično se ne menja, dakle one su agregaciono stabilne.



**Slika 38.** UV-Vis spektri; 1- $\text{AgNO}_3$  (227 nm i 303 nm), 2- ekstrakt (225 nm, 282 nm i 322 nm), 3- kompleks sobna nakon 5 minuta (436 nm), 4- kompleks sobna nakon 30 minuta, 5- kompleks sobna nakon 60 minuta, 6- kompleks sobna nakon 90 minuta, (438 nm), 7- kompleks sobna nakon 120 minuta (439 nm) i 8- kompleks sobna nakon 15 dana (444 nm)

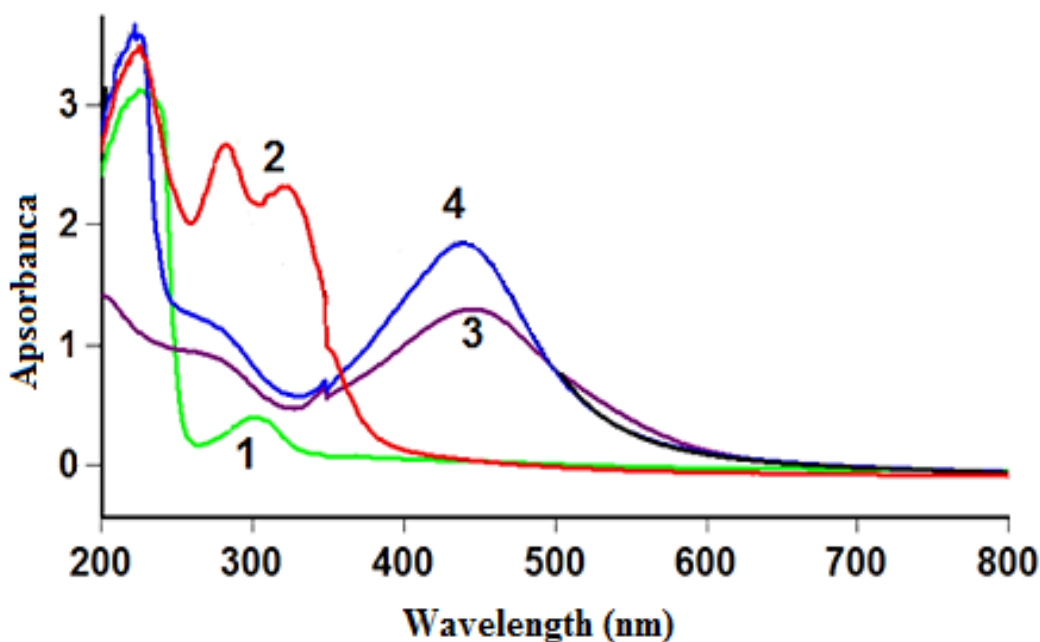
U UV-Vis spektrima uzoraka sintetisanih na temperaturi ključanja reakcione smeše postoji traka od SPR prelaza na oko 440 nm, čiji intenzitet se ne menja posle 30 minuta reakcije, a takođe ni položaj. Ove činjenice ukazuje, s jedne strane da se formiranje AgNPs-E završava brže u odnosu na sintezu na sobnoj temperaturi, a s druge strane da je veličina od 18 nm određena prema (Bednar, 2014) nešto manja u odnosu na one sintetisane na sobnoj temperaturi. Posle 90 minuta nisu uočene promene u položaju trake, niti posle stajanja kompleksa u toku 15 dana, što govori u prilog njihove agregativne stabilnosti u tom periodu.



**Slika 39.** UV-Vis spektri; 1-AgNO<sub>3</sub>, (227 nm i 303 nm), 2-ekstrakt (225 nm, 282 nm i 322 nm), 3-kompleks nakon zagrevanja 60 minuta (221 nm i 440 nm), 4- kompleks nakon zagrevanja 30 minuta (436 nm) i 5- kompleks nakon zagrevanja 90 minuta (440 nm)

Pažnja ranijih istraživača (Amooaghaie i sar., 2015; Sathishkumar i sar., 2009; Bar i sar., 2009; MubarakAli i sar., 2011; Vilchis-Nestor i sar., 2008; Shankar i sar., 2004; Abu Bakar i sar., 2007; Vigneshwaran i sar., 2006; Chandran i sar., 2006; de Aragão i sar., 2016; Ebrahiminezhad i sar., 2016; Huang i sar., 2007; Sabri i sar., 2016) uglavnom je usmerena na ispitivanju UV-Vis oblasti preko 300 nm sa ciljem potvrde postojanja AgNPs (SPR trake) i njihove stabilnosti, dok je FTIR analiza korišćena da se identifikuju potencijalni biomolekuli odgovorni za redukciju i stabilizaciju AgNPs i predviđanje njihove uloge u procesu sinteze (Amooaghaie i sar., 2015; Sathishkumar i sar., 2009; Bar i sar., 2009; MubarakAli i sar., 2011; Vilchis-Nestor i sar., 2008; Shankar i sar., 2004; Abu Bakar i sar., 2007; Vigneshwaran i sar., 2006; Chandran i sar., 2006). Međutim, i UV-Vis analiza može da ukaže na potencijalne funkcionalne grupe biomolekula koje učestvuju u ovim procesima, pa smo mi zbog toga spektre snimili počev od 200 nm. Pokazalo se da (v. Sl. 39 i Sl. 40) ekstrakt *Fumaria officinalis* L, u UV oblasti spektra poseduje trake na oko 230, 270 i 335 nm. Ove trake su, najčešće, rezultat  $\pi$ - $\pi^*$  i  $n$ - $\pi^*$  prelaza karboksilne grupe, karbonskih kiseline i njihove derivate, ketone, aldehide, amide i biomolekule iz grupe flavona i njihovih derivata (Saleh i

Khalet, 2013; McConnell i sar., 1993), pa se trake od ovih prelaza očekuju i u našem spektru, imajući u vidu sastav ekstrakta (Glišić i sar., 2016; Latif i sar., 2012; Ivanov i sar., 2014). Njihov intenzitet je značajno smanjen u spektrima AgNPs-E, što ukazuje na zaključak da su funkcionalne grupe sa slobodnim elektronskim parom (CO ili amidna) napred navedenih grupa jedinjenja uključene u redukciju jona srebra. Trake na oko 227 nm i 303 nm u spektru AgNO<sub>3</sub> prisutne su i u spektrima AgNPs-E, a ne u spektru dijaliziranog uzorka (v. Sl. 40). Ova činjenica upućuje na zaključak da nakon sinteze zaostaju nitratni joni koji se uklanjaju dijalizom. Manje batohromno pomeranje SPR trake (oko 10 nm) nakon dijalize ukazuje na povećanje razmera AgNPs-E čestica, tj. na činjenicu da, verovatno, nitratni joni imaju ulogu u stabilizaciji čestica.

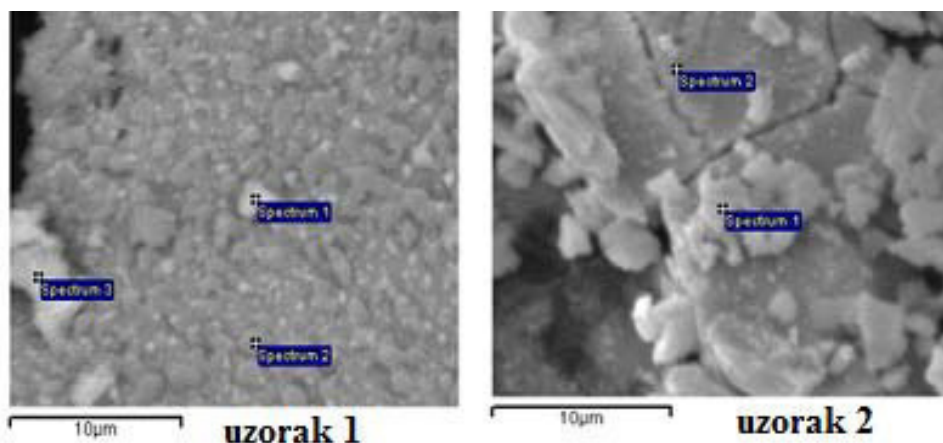


**Slika 40.** UV-Vis spektri; 1-AgNO<sub>3</sub>, 2-ekstrakt, 3-kompleks nakon dijalize i 4-kompleks nakon zagrevanja 30 minuta

#### 4.5.2. SEM mikroskopija

Morfologija AgNPs-E čestica je okarakterisana SEM analizom. SEM mikrografi ili uzorci 1 i 2 su prikazani na Slici 41. Ovi SEM mikrografi prikazuju nepravilne sferne čestice sa prosečnom veličinom 25 nm (uzorak 1), što potvrđuje nalaze dobijene primenom metode

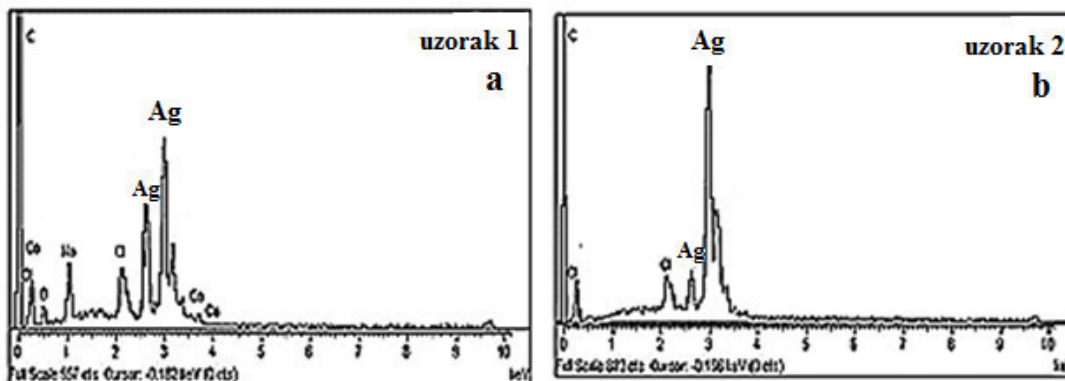
UV-Vis, koje se često aglomerišu u male agregate. Veliki agregati AgNPs-E nepravilne strukture, bez dobro definisane morfologije takođe su pronađeni u uzorku (v. Sl. 41).



**Slika 41.** Skenirajući elektronski mikrografi AgNPs-E sintetisane na sobnoj temperaturi (uzorak 1) i temperaturi ključanja (uzorak 2)

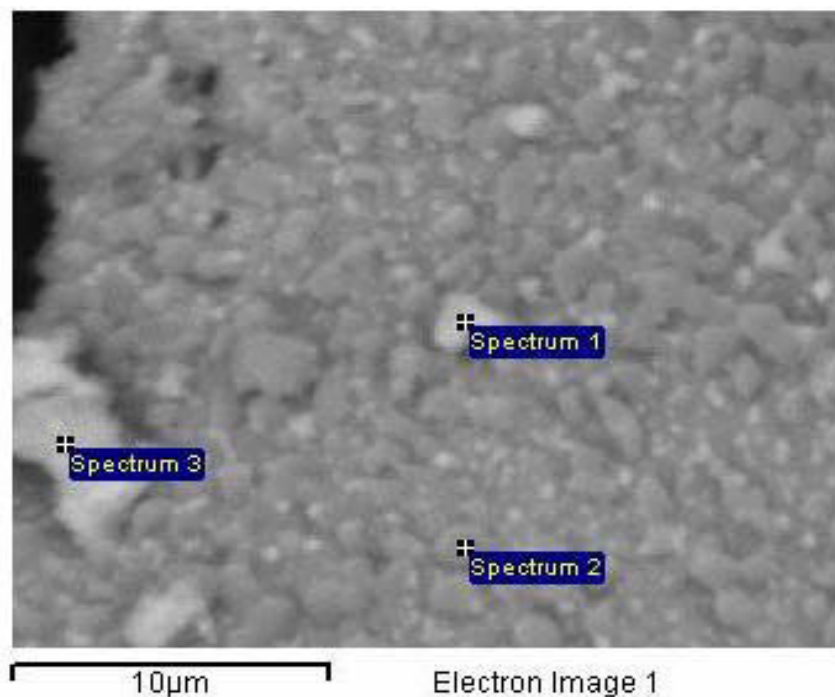
#### 4.5.3. EDX analiza

EDX spektroskopija korišćena je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu srebra uključenog u formiranje AgNPs-E. EDX spektri od dva istražena uzorka prikazani su na Slici 42. U oba slučaja je na 3 keV nađen jak signal koji odgovara elementarnom srebru zbog površinske plazmonske rezonance. Niži signali koji dolaze iz C i O potvrđuju formiranje AgNPs kao deo AgNPs-E. Nakon kalibracije, korišćenjem standarda čistog elementa, korišćen je INCA softver za određivanje sadržaja Ag koji je  $\sim 35\%$  u uzorku 1 (v. Sl. 42a) i  $\sim 70\%$  u uzorku 2 (v. Sl. 42b).



**Slika 42.** EDX spektri AgNPs-E sintetisane na sobnoj temperaturi (a) i temperaturi ključanja (b)

Za uzorak 1 odabrane su tri čestice koje su označene na Slici 43. Kvalitativno i kvantitativno određivanje u uzorku 1, a rezultati određivanja nekih elemenata su prikazani u Tabeli 14.



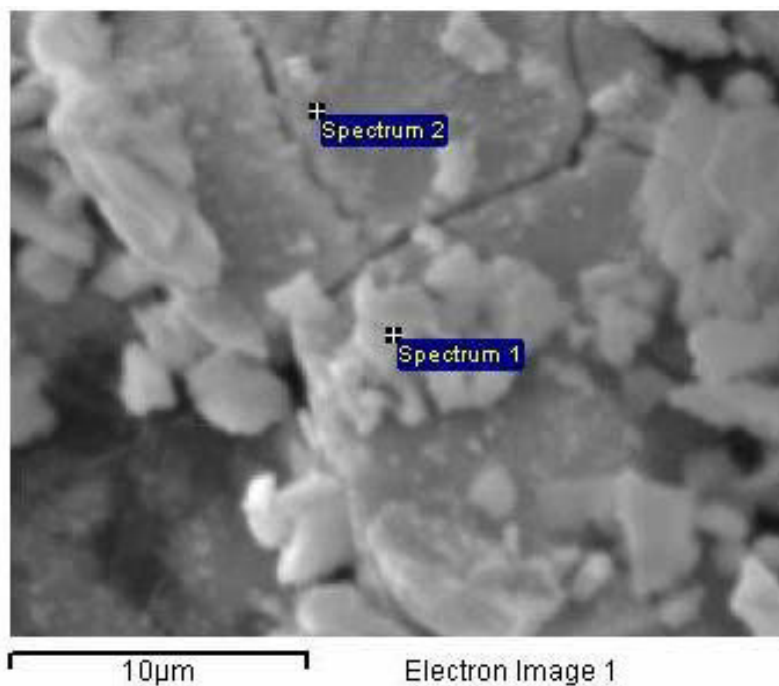
**Slika 43.** Skenirajući elektronski mikrograf AgNPs-E sintetisane na sobnoj temperaturi (uzorak 1)

Kako se može videti iz Tabele 14, sadržaj srebra kreće se od min 27,82 % pa do max 43,61 %. Prosečan sadržaj srebra iznosi 33,91 %.

**Tabela 14.** Kvalitativno i kvantitativno određivanje nekih elemenata u uzorku 1

Uzorak 1	C	O	Na	Cl	Ar	Ca	Ag	Total
Spectrum 1	38.25	15.19	6.14	7.80	1.68	0.61	30.32	100.00
Spectrum 2	31.76	11.87	11.66	14.45	2.44		27.82	100.00
Spectrum 3	33.45	10.87	2.77	5.44	3.86		43.61	100.00
Max.	38.25	15.19	11.66	14.45	3.86	0.61	43.61	
Min.	31.76	10.87	2.77	5.44	1.68	0.00	27.82	

Za uzorak 2 odabrane su dve čestice koje su označene na Slici 44. Kvalitativno i kvantitativno određivanje u uzorku 2, a rezultati određivanja nekih elemenata prikazani su u Tabeli 15.



**Slika 44.** Skenirajući elektronski mikrograf AgNPs-E sintetisane na temperaturi ključanja (uzorak 2)

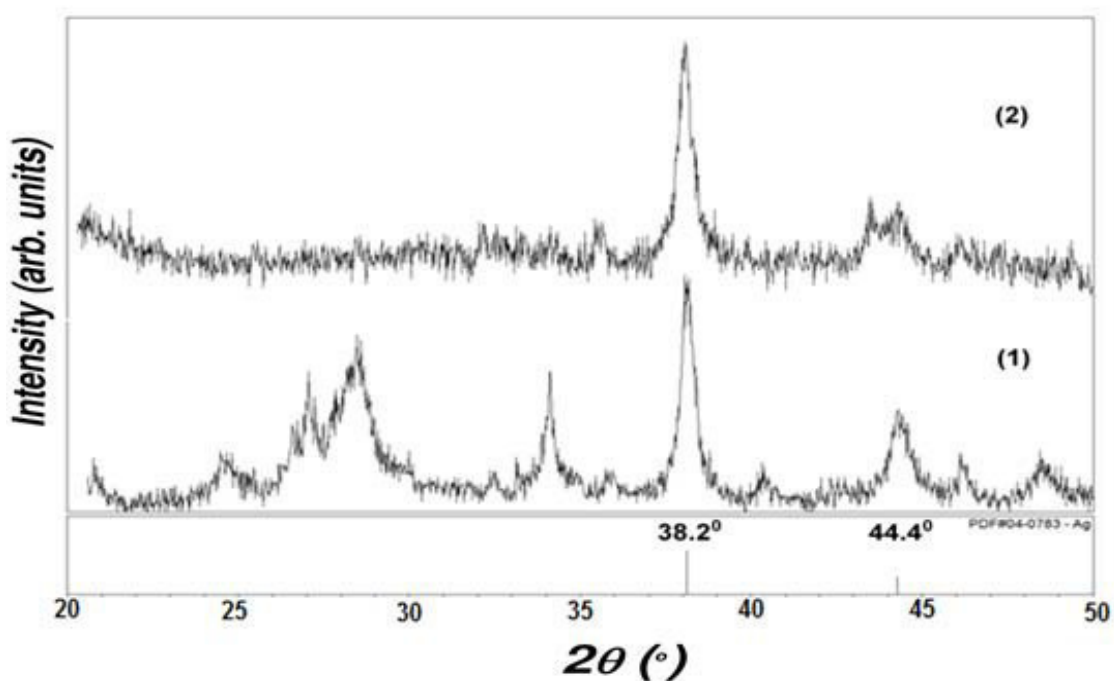
Kako se može videti iz Tabele 15, sadržaj srebra u jednoj čestici je 59,14 %, a u drugoj 81,17 %, tako da bi prosečan sadržaj čestica iznosio 70,15 % u uzorku 2.

**Tabela 15.** Kvalitativno i kvantitativno određivanje nekih elemenata u uzorku 2

Uzorak 2	C	Cl	Ar	Ag	Total
Spectrum 1	34.04	2.86	3.96	59.14	100.00
Spectrum 2	11.15	2.81	4.88	81.17	100.00
Mean	22.59	2.83	4.42	70.15	100.00
Std. deviation	16.19	0.04	0.65	15.57	
Max.	34.04	2.86	4.88	81.17	
Min.	11.15	2.81	3.96	59.14	

#### 4.5.4. Difrakcija X-zraka (XRD)

Metoda difrakcija X-zraka je korišćena za detekciju elementarnog srebra. Za površinski centriranu kubnu rešetku srebra karakteristični su pikovi na oko  $2\theta$  38.2°, 44.4°, 64.7° i 77.4° koji odgovaraju (111), (200), (220) i (311) refleksionim ravnima, respektivno (Clearfield i sar., 2008). Na Slici 45 prikazani su XRD difraktogrami čestica AgNPs-E sa ekstraktom *Fumaria officinalis* L, sintetisanih na sobnoj i temperaturi ključanja. Kako se može videti oba uzorka imaju pikove na  $2\theta$  38.2° i 44.4°, što potvrđuje prisustvo AgNPs-E u finalnom proizvodu.



Slika 45. XRD difraktogrami AgNPs-E sintetisane na sobnoj (1) i temperaturi ključanja (2)

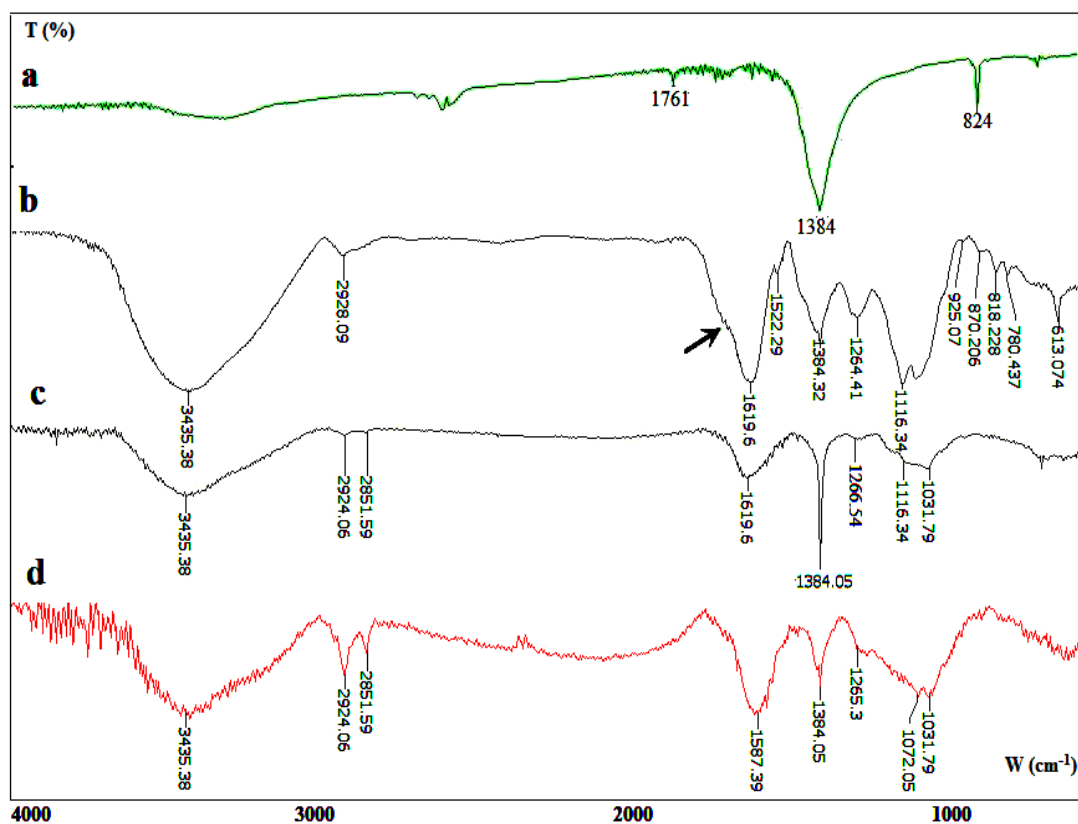
Određivanje veličine AgNPs prema Scherrerovoj jednačini (7), vršeno je na Braggovoj refleksiji na 38.2° i 44.4°  $2\theta$ , što daje srednju veličinu kristalita na sobnoj temperaturi i temperaturi ključanja  $20 \pm 1$  nm i  $18 \pm 1$  nm, respektivno.

#### 4.5.5. FTIR spektroskopija

Hemijske funkcionalne grupe apsorbiraju IR zračenje u specifičnom području u zavisnosti od strukture ostatka molekula. Spektar strukturne korelacije može da ukaže na grupe koje su uključene u proces redukcije srebra kao zaštitni agens koji sprečava aglomeraciju i stabilizaciju formulacije AgNPs-E (Ebrahimnezhad i sar., 2012; Kumar i sar., 2010; Kumar i Yadov, 2009). Na Slici 46 prikazani su FTIR spektri ispitivanih uzoraka. U FTIR spektru ekstrakta nalaze se široke kompleksne trake koje oslikavaju kompleksni sastav ekstrakta. Trake u oblasti 3600 do 3200  $\text{cm}^{-1}$  potiču od valentnih OH (alkoholi, fenoli) i/ili NH vibracija (amini, amidi, peptide i protein). Trake na oko 2920 i 2850  $\text{cm}^{-1}$  rezultat su  $\nu(\text{CH})$  vibracija  $\text{CH}_2$  – grupe. Trake oko 1620 i 1530  $\text{cm}^{-1}$  mogu se pripisati  $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$ , primarni amidi ili peptidi: Amid I  $\nu(\text{C}=\text{O})$  i Amid II  $\delta(\text{N-H})$  respektivno, i/ili  $\nu(\text{C}=\text{O})$  polifenola. Široka intenzivna traka sa prevojem na višefrekventnoj strani u oblasti oko 1630  $\text{cm}^{-1}$  (označena strelicom) može biti rezultat  $\nu(\text{C}=\text{O})$  karbonilne grupe organske kiseline OR  $\nu(\text{C}=\text{C})$  (polifenoli). Široka traka čiji je centroid oko 1385  $\text{cm}^{-1}$  sa prevojem na višefrekventnoj strani potiče najverovatnije od  $\delta(\text{CH})$  i/ili  $\delta(\text{OH})$  vibracije (alkoholni tip polisaharida). U oblast oko 1250  $\text{cm}^{-1}$  očekuju se trake od  $\delta(\text{C-OH})$  vibracija molekuli koji sadrže funkcionalne grupe sa kiseonikom ili azotom kao NH,  $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$ , CNO, C-O-C i OH grupu, a koje mogu imati ulogu u redukciji i stabilizaciji AgNPs. Ove činjenice ukazuju da jedinjenja koja su povezana sa AgNPs-E mogu biti polifenoli, proteinske ili organske kiseline, alkoholi, fenoli i polioli. U oblasti 1200 do 1000  $\text{cm}^{-1}$  očekuju se trake od valentnih  $\nu(\text{C-O})$ , i  $\nu(\text{C-O-C})$  vibracija (kao i traka od valentine  $\nu(\text{C-N})$  vibracije alifatičnih amina) koje ukazuju na prisustvo flavonoida, polifenola, terpenoida, polisaharida, glikozida, organskih kiselina i sl. (Amooaghaie i sar., 2015; Sathishkumar i sar., 2009; Bar i sar., 2009; Ebrahimnezhad i sar., 2012; Huang i sar., 2007). Trake u oblasti oko 770 do 900  $\text{cm}^{-1}$  od deformacione C-H vibracije van ravni ukazuju na prisustvo polifenola (Kumar i sar., 2010). Ovi nalazi su u skladu sa podacima o sastavu ekstrakta (Glišić i sar., 2016; Latif i sar., 2012; Ivanov i sar., 2014).

U FTIR spektru AgNPs-E za razliku od spektra ekstrakta (v. Sl. 46), značajno je smanjen intenzitet centroida trake oko 1385  $\text{cm}^{-1}$  i one na oko 1250  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta(\text{OH})$  vibracije).





**Slika 46.** FTIR spektri  $\text{AgNO}_3$  (a), vodeni ekstrakt *Fumaria officinalis* (b), AgNPs-E pre (c) i nakon dijalize (d)

Dalje, u oblasti vibracija amidne grupe traka od  $\nu(\text{C}=\text{O})$  pomeren je za oko  $30 \text{ cm}^{-1}$  (sa  $1619 \text{ cm}^{-1}$  na  $1590 \text{ cm}^{-1}$ ) ka nižim vrednostima talasnog broja, dok trake oko  $1530 \text{ cm}^{-1}$  nema kao i prevoja na  $1630 \text{ cm}^{-1}$ . Ovo ukazuje na učešće amido grupe u redukciji srebra i stabilizaciji AgNPs, verovatno na formiranje veze sekundarne amido grupe  $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$  grupe sa jonima srebra kao deo AgNPs-E, što su uočili i autori rada (Bar i sar., 2009) ispitujući nanočestice srebra sa ekstraktom *Jatropha curcas*, ali i drugi (Nikolić i sar., 2016; Glišić i sar., 2015, Cakić i sar., 2016).

Uočavaju se promene i u oblasti  $\nu(\text{C}-\text{O})$  i  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$  valentnih vibracija (značajno je smanjen intenzitet trake na  $1160 \text{ cm}^{-1}$ ). Ove činjenice sugerišu da molekuli koji sadrže funkcionalne grupe sa kiseonikom ili azotom kao NH,  $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$ , CNO, C-O-C i OH grupu imaju ulogu u redukciji i stabilizaciji AgNPs-E. To znači da jedinjenja koja stabilizuju AgNPs mogu biti polifenoli, flavonoidi, triterpenoidi, proteini, organske kiseline ili polisaharidi. Uporedjenje spektra nedijaliziranog i dijaliziranog uzorka pokazuje da u spektru uzorka koji je dijaliziran

nema trake oko  $1384\text{ cm}^{-1}$ , što jasno ukazuje da ona potiče od zaostalih nitratnih jona. U prilog tome je i činjenica da srebro nitrat čiji je spektar prikazan na Slici 17a, ima traku na oko  $1384\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje asimetričnoj valentnoj vibraciji nitratnog jona.

#### 4.5.6. Antimikrobna aktivnost nanočestica AgNPs-E

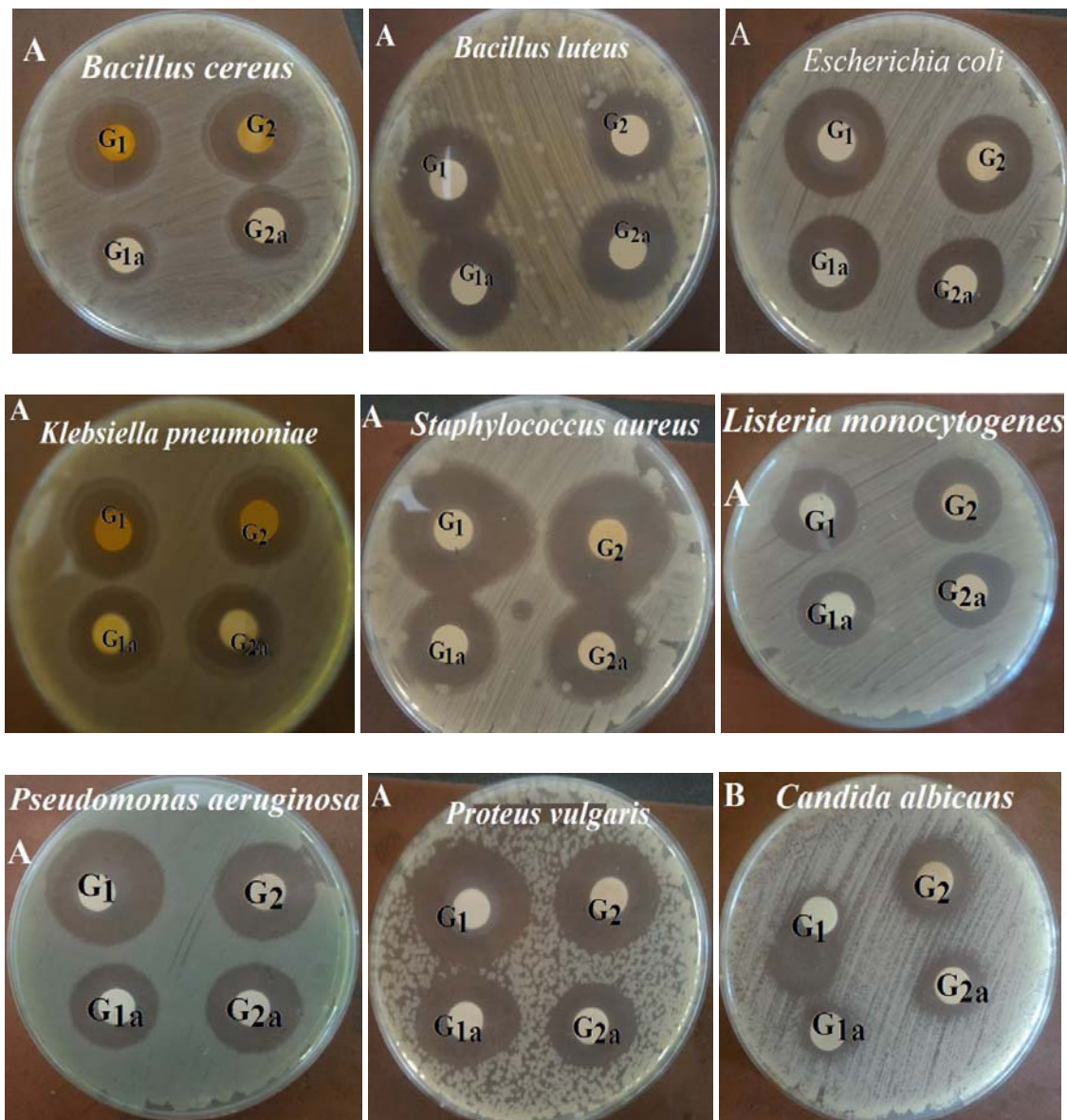
Sintetizovane nanočestice AgNPs-E pokazale su antimikrobnu aktivnost prema svim analiziranim test mikroorganizmima (v. Tab. 16).

**Tabela 16.** Radijalni prečnik zona inhibicije za testirane bakterijske i gljivične sojeve

Radijalni prečnik zona inhibicije (mm)						
AgNPs-E						
G <sub>1</sub> , G <sub>1a</sub> - sobna temperatura		G <sub>1</sub> = 1	G <sub>1a</sub> = 0,5	G <sub>2</sub> = 1	G <sub>2a</sub> = 0,5	
G <sub>2</sub> , G <sub>2a</sub> - temperatura ključanja		mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	
Bakterijski sojevi	Gram pozitivne	<i>Staphylococcus aureus</i>	28	23	30	25
		<i>Bacillus cereus</i>	25	17	25	21
		<i>Bacillus luteus in haus strain</i>	25	23	20	22
		<i>Listeria monocytogenes</i>	22	20	23	20
	Gram negativne	<i>Escherichia coli</i>	25	23	23	22
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	22	24	23
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	22	21	22
		<i>Proteus vulgaris</i>	28	25	25	22
Gljivični soj	<i>Candida albicans</i>	18	13	17	15	

Inhibicija je primećena kod svih analiziranih bakterijskih sojeva sa koncentracijom 0,5 mg/ml AgNPs-E, što ukazuje na to da je minimalna inhibitorna koncentracija na ove mikroorganizme niska. AgNPs-E u različitim koncentracijama pokazale su niz specifičnosti prema antimikrobnoj aktivnosti (v. Sl. 47). Uočeni antimikrobni efekat AgNPs-E bio je veći

nego kod AgNPs stabilizovanih sa karboksimetil dekstranom ili dekstran sulfatom (Glišić i sar., 2015, Cakić i sar., 2016). Temperatura formiranja AgNPs-E nije imala značajan uticaj na antimikrobnu aktivnost. Ovo nije u skladu sa podacima koje su izneli (Nagajyothi i Lee, 2011), što je ukazivalo da su AgNPs nanočestice sa biljkama formirane na 80 °C, imale niži antimikrobni efekat u odnosu na one koje su formirane na sobnoj temperaturi. Najveća inhibicija od 1 mg/ml AgNPs-E primećena je protiv *St. aureus* sa zonama inhibicije 30 mm za kompleks koji se formira na temperaturi ključanja i 28 mm za kompleks formiran na sobnoj temperaturi. Takođe, velika je inhibicija sa *P. vulgaris* sa zonama inhibicije od 28 mm i 25 mm izazvana koncentracijom od 1 mg/ml. *L. monocytogenes* je bio najmanje osetljiv sa zonom inhibicije u opsegu od 20-23 mm. Među Gram pozitivnim bakterijama najmanja zona inhibicije od 17 mm potiče od AgNPs-E formirane na sobnoj temperaturi i primenjene u koncentraciji od 0,5 mg/ml. Nije postojala značajna razlika između inhibicije rasta Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Iako su naveli (Tamboli i Lee, 2013) da su Gram negativne bakterije osetljivije na uticaj AgNPs-E. Antimikrobni efekat AgNPs može se objasniti sa nekoliko mehanizama. AgNPs mogu biti uključene u stvaranje jama u membrani koje dovode do oštećenja membrane (Shrivastava i sar., 2007). Promene u membrani utiču na njenu propusnost i narušavaju normalan transport kroz membranu koja može izazvati smrt ćelije (Tamboli i Lee, 2013). Pored toga, joni srebra koji ulaze u ćeliju mogu inaktivirati vitalne enzime i poremetiti ćelijski metabolizam (Klaine i sar., 2008). Takođe, penetracija srebra u ćeliju može uticati na sintezu proteina i uticati na oštećenje DNK (Feng i sar., 2000). Suprotno visokoj antibakterijskoj aktivnosti koja je prikazana, antifungalna aktivnost protiv *C. albicans* bila je znatno niža. Zone inhibicije od 18 i 17 mm primećene su za 1 mg/ml AgNPs-E formirane na sobnoj temperaturi i na temperaturi ključanja, respektivno. Zona inhibicije od 0.5 mg/ml formirane AgNPs-E na sobnoj temperaturi, bila je najniža u ovom ispitivanju, 13 mm. Manje zone inhibicije za aktivnost AgNPs protiv *C. albicans* već je navedeno u AgNPs-CMD i AgNPs-DS (Glišić i sar., 2015, Cakić i sar., 2016).



**Slika 47.** Antimikrobna aktivnost nanočestica različite koncentracije AgNPs-E protiv bakterijskih sojeva *Bacillus cereus*, *Bacillus luteus in haus strain*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus vulgaris* (A) i gljivičnog soja *Candida albicans* (B)

#### 4.6. Globalna struktura AgNPs

Pitanje globalne strukture AgNPs i prirode interakcija i stabilizacije su još uvek otvorene. Prema jednom mišljenju, u vodenom rastvoru koji sadrži jone mogu se adsorbovati anjoni

koji daju površinski negativno naelektrisanje čestica što sprečava aglomeraciju. O- donor grupe mogu donirati elektrone čime se omogućava da se  $\text{-OH}^-$  i/ili  $\text{-NH}^-$  veže na površini čestica AgNPs koordinativnom ili jonskom vezom. Prema drugom mehanizmu, stabilizacija je rezultat sternog odbijanja organskih supstanci ili drugih koje mogu da se adsorbuju na površinu AgNPs, prethodno redukujući  $\text{Ag}^+$  jone i sprečavaju kontakt između nanočestica, što omogućava sternu stabilizaciju nanočestica.

Spektar strukturne korelacije, primenom metode FTIR spektroskopije mogu da pomognu kod razjašnjenja globalne strukture sintetizovanih nanočestica srebra. U tom cilju vršeno je upoređivanje spektara kompleksa Cu i Co sa CMD sa onim AgNPs-CMD u oblasti karakterističnih vibracija karboksilne grupe.

Analiza položaja, intenziteta i razlika u frekvenciji vibracija za O-donor ligande tipa kiselina dobar je pokazatelj dentatnosti karboksilne grupe u koordinaciji sa jonima tipa M(II). Kod ovakvog upoređivanja treba imati u vidu stehiometriju kompleksa Cu i Co sa CMD o kojoj je ranije diskutovano, kao i činjenicu da slična spektralna slika u oblasti vibracija svih tipova karboksilatne grupe bi ukazivala na slično okruženje i interakcije ove grupe sa navedenim metalima. U literaturi (Basuny i sar., 2015) je predložena globalna struktura nanočestica srebra sa karboksimetil celulozom, na osnovu položaja traka od  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  i razlike u frekvenciji  $226 \text{ cm}^{-1}$  ( $1605\text{-}1379 \text{ cm}^{-1}$ ), što bi odgovaralo intermedijalnom stanju između mono- i bidentatnih kompleksa, što sugeriše koordinaciju  $\text{-COO}^-$  grupe sa  $\text{Ag}^+$  jonom. Međutim, primećeno je i da se u spektru nanočestica srebra sa karboksimetil celulozom traka od valentne  $\nu(\text{OH})$  vibracije pomera ka nižim vrednostima (za oko  $8 \text{ cm}^{-1}$  u odnosu na CMC). Na osnovu ovoga je zaključeno da su i hidrosilne grupe glukopiranoznih jedinica celuloze uključene u proces deprotonizacije i redukcije  $\text{Ag}^+$  jona i da ovako negativna grupa učestvuje u stabilizaciji čestica zahvaljujući jakim jonskim interakcijama, kao što je prikazano na Slici 48. U radu (Zhang i sar., 2017) su ispitivane nanočestice srebra sa pululanom i oksidovanim pululanom. Pokazalo se da u slučaju AgNPs sa čistim pululanom postoji promena u oblasti valentnih  $\nu(\text{OH})$  vibracija tako što je traka od ove vibracije u odnosu na čist pululan pomerena za oko  $20 \text{ cm}^{-1}$  ka višim vrednostima. Na osnovu ovog kriterijuma je zaključeno da hidrosilne grupe učestvuju u redukciji  $\text{Ag}^+$  i u stabilizaciji nanočestica na taj način što postoje jake interakcije između O- sa površinskim  $\text{Ag}^+$  jonima. U slučaju pak nanočestica AgNPs sa oksidovanim pululanom trake od  $\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$  ( $1418 \text{ cm}^{-1}$ ) i  $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$  ( $1608 \text{ cm}^{-1}$ ) pripisane su deprotonovanoj karboksilnoj grupi oksidovanog pululana

pa prema ovom nalazu potvrđeno je formiranje veze karboksilne grupe sa AgNPs, što su ranije uočili (Shankar i sar., 2004).

U Tabeli 17 prikazane su frekvencije valentnih  $\nu(\text{OH})$  i  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vibracija za jedinjenje Cu-CMD, Co-CMD i AgNPs-CMD.

**Tabela 17.** Frekvencije valentnih  $\nu(\text{OH})$  i  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vibracija jedinjenja Cu-CMD, Co-CMD i AgNPs-CMD

Uzorak	$\nu(\text{OH})$	$\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$	$\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$	$\Delta\nu = \nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O}) - \nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$
<b>Cu-CMD</b>	3439	1603	1414	189
<b>Co-CMD</b>	3495	1595	1420	175
<b>AgNPs-CMD</b>	3447	1603	1418	185

Kao što može da se vidi položaj traka  $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$  vibracija kod Cu-CMD, Co-CMD i AgNPs-CMD veoma je blizak, kao i razlike u frekvenciji dveju vibracija, što ukazuje na sličnu prirodu interakcija između jona metala i karboksilne grupe u svim slučajevima.

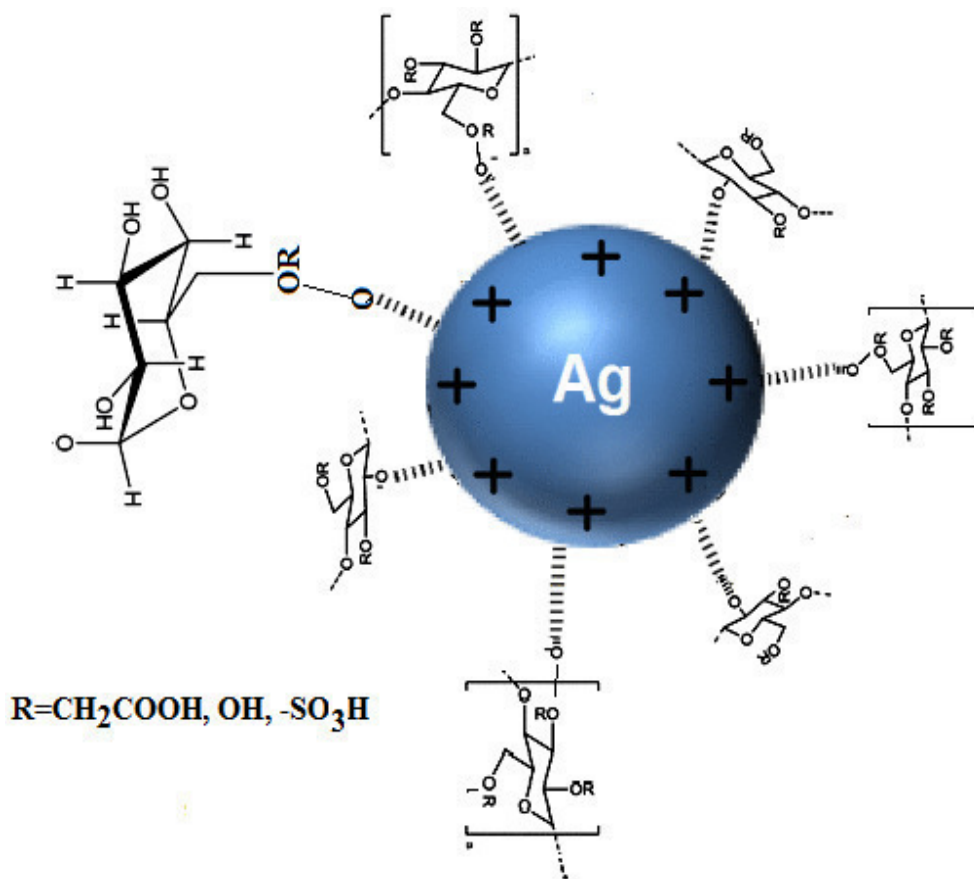
Razlika u frekvenciji koja se kreće od 175 do 189  $\text{cm}^{-1}$  pokazuje da se karboksilna grupa CMD ponaša, verovatno, kao bidentatni ligand, pa je razumljivo da se usled delokalizacije elektrona red veze menja od liganda do kompleksa. Delokalizacija elektrona unutar okruženja metala nije potpuna, tako da je jedna CO veza karboksilne grupe pretežno dvostruka, a druga jednostruka, što ukazuje nešto povećana vrednost razlike u frekvenciji ovih vibracija.

Kod kompleksa Co-CMD u odnosu na polazni CMD položaj centroida trake u oblasti oko 3400  $\text{cm}^{-1}$  pomeren je za oko 50  $\text{cm}^{-1}$  prema višim frekvencijama. Ovo s jedne strane može da znači da su neke od vodonikovih veza raskinute, a s druge strane da neke od hidroksilnih grupa učestvuju u redukciji  $\text{Ag}^+$  jona i da tako jonizovana  $\text{OH}^-$  grupa jako interaguje sa  $\text{Ag}^+$  jonom. Učešće OH grupa u redukciji i stabilizaciji je verovatno, imajući u vidu složenu strukturu glukopiranozne jedinice, dužinu lanca CMD, DS i njihovu helikoidnu strukturu koja omogućava obuhvatanje čestice AgNPs i više kontakata funkcionalnih grupa sa površinskim

česticama srebra. Međutim, za donošenje decidentnih zaključaka potrebna su dodatna ispitivanja (recimo merenje  $\zeta$ -potencijala).

Na osnovu napred izloženog razmatranja predložen je model strukture koji je prikazan na Slici 48, pri čemu treba imati u vidu da se lanci karboksimetil dekstrana ne šire “zrakasto“ (što do sada nije uočeno primenom metoda SEM i TEM analize), već najverovatnije obuhvataju formiranu česticu srebra formirajući tanak sloj koji je razlog stabilnosti AgNPs, zbog interakcija odbojne prirode sa susednim česticama. Slična situacija bi bila i kod AgNPs-E, kod kojih bi reducirane nanočestice srebra bile okružene tankim slojem organskih supstanci (što sprečava aglomeraciju), od kojih neke koje sadrže funkcionalne grupe sa kiseonikom ili azotom kao NH, (NH)C=O, CNO, C-O-C i OH imaju ulogu u redukciji, s jedne, a s druge strane u stabilizaciji AgNPs-E, povezane jakim vezama sa površinskim jonima srebra.

Imajući u vidu raniju diskusiju o spektar strukturnim korelacijama kompleksa Cu-DS i Co-DS s jedne strane, a s druge AgNPs-DS, koja je pokazala da su ova jedinjenja pretežno jonska po svojoj prirodi, kao i to da se joni Cu i Co nalaze u okruženju sa 6 atoma kiseonika (4 iz dve sulfatne grupe DS i dva iz dva molekula vode), može se zaključiti da je slična situacija i u slučaju AgNPs-DS. Ove interakcije omogućavaju, s jedne strane, formiranje veze između sulfo grupe i Ag<sup>+</sup> jona sa površine AgNPs, a s druge strane formiranje makromolekularnog lanca obuhvatajući česticu koja deluje kao stabilizirajući agens.



Slika 48. Dvodimenzionalni model struktura AgNPs

#### 4.7. Uporedna analiza antimikrobne aktivnosti AgNPs

Sintetizovane nanočestice AgNPs-E, AgNPs-DS i AgNPs-CMD pokazale su antimikrobnu aktivnost prema sledećim analiziranim test mikroorganizmima (v. Tab. 18).

U Tabeli 18 dat je uporedni prikaz radijalnih zona inhibicije za testirane bakterijske i gljivične sojeve za dve različite koncentracije AgNPs. Za razliku od AgNPs-E, koji je pokazao antimikrobnu aktivnost kod svih ispitivanih uzoraka, AgNPs-DS i AgNPs-CMD nisu pokazale aktivnost na gljivični soj *C. albicans*, a AgNPs-CMD i na *P. aeruginosa* u koncentraciji od 0,5 mg/ml.



**Tabela 18.** Uporedni prikaz radijalnih prečnika zona inhibicije za testirane bakterijske i gljivične sojeve

Radijalni prečnik zona inhibicije (mm)										
G <sub>1</sub> , G <sub>1a</sub> - sobna temperatura G <sub>2</sub> , G <sub>2a</sub> - temperatura ključanja		AgNPs-E				AgNPs-DS		AgNPs-CMD		
mg/ml		G <sub>1</sub> 1	G <sub>1a</sub> 0,5	G <sub>2</sub> 1	G <sub>2a</sub> 0,5	0,5	1	0,5	1	
Bakt. sojevi	G+	<i>S. aureus</i>	28	23	30	25	18	19	18	21
		<i>B. cereus</i>	25	17	25	21	18	19	12	14
		<i>B. luteus</i>	25	23	20	22	21	24	13	20
		<i>B. subtilis</i>	x	x	x	x	17	19	x	x
		<i>L.monocytogenes</i>	22	20	23	20	17	18	x	x
	G-	<i>P. aeruginosa</i>	26	22	24	23	24	26	-	12
		<i>K. pneumoniae</i>	24	22	21	22	18	19	14	15
		<i>E. coli</i>	25	23	23	22	18	21	x	x
<i>P. vulgaris</i>		28	25	25	22	14	15	x	x	
Gljiv. soj	<i>C. albicans</i>	18	13	17	15	-	16	-	11	

x- nije rađeno, - nema dejstva

Međusobno upoređivanje veličine radijalnih zona inhibicije pokazuje da su one najveće u slučaju AgNPs-E, nešto su manje kod AgNPs-DS, a najmanje kod AgNPs-CMD. Takođe, zone inhibicije kod svih analiziranih bakterijskih sojeva su veće kada je koncentracija AgNPs 1 mg/ml nego li za 0,5 mg/ml. Imajući u vidu činjenicu da vodeni ekstrakt dimnjače ima složen hemijski sastav u kome su pored ostalih zastupljeni i biomolekuli koji i sami poseduju antimikrobnu aktivnost, najveća antimikrobna aktivnost AgNPs-E može se objasniti sinergističkim delovanjem srebra i ekstrakta na mikroorganizme.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti sintetisanih AgNPs pokazuju da mogu imati potencijalnu primenu u biomedicinskom polju za izradu različitih preparata u humanoj medicini, kozmetici, veterini i prehrambenoj industriji.

## **5. ZAKLJUČAK**

Sprovedena istraživanja radi dobijanja odgovora na postavljene ciljeve ove disertacije pokazala su:

- Razvijeni su postupci sinteze kompleksa bakra i kobalta sa karboksimetil dekstranom i dekstran sulfatom, sa prinosom jedinjenja Cu-CMD 64 %, odnosno Cu-DS oko 25 %, i sadržajem bakra od 12,1 %, odnosno 12,5 % respektivno, a kod Co-CMD 76 %, odnosno Co-DS 67 % sa sadržajem kobalta 12,1 %, odnosno 10,7 % respektivno. Na osnovu sadržaja bakra i kobalta, kao i rezultata dobijenih primenom Jobb-ove metode, odnosno metode molskog odnosa, utvrđen je molski odnos Cu : CMD ~ 1:2, a kod Cu : DS ~ 1:1, odnosno Co : CMD ~ 1:2 i Co : DS ~ 1:1.
- Kod ovakvog odnosa M:L koordinaciona sfera metala je dopunjena sa dva koordinirana molekula vode do koordinacionog broja 6, pa se tako formiraju kompleksi nepravilne oktaedarske strukture, na šta ukazuje zelena boja kompleksa bakra, odnosno roze kod kobalta.
- Promene koje se javljaju u UV oblasti, u odnosu na polazne ligande kod kompleksa (batohromni i hiperhromni efekat za  $n \rightarrow \pi^*$  prelaze karboksilne, odnosno sulfo hromoforne grupe), rezultat su promjenjene elektronske gustine, odnosno formiranja koordinativne veze. Trake u vidljivoj oblasti spektra, kod Cu-CMD na  $\lambda_{\max} = 744$  nm, a kod Cu-DS na 698 nm, prema položaju i intenzitetu mogu se pripisati prelazima  $d \rightarrow d$  tipa u centralnom metalnom jonu bakra konfiguracije  $\text{Cu}^{2+}:[\text{Ar}] 3d^9$ . U vidljivoj oblasti spektra kod jedinjenja Co-CMD javlja se široka traka na  $\lambda_{\max} = 510$  nm, a kod Co-DS na 500 nm, pripisane,  $d \rightarrow d$  prelazu naelektrisanja sa O donor atoma liganda na Co(II)-jon, što opet ukazuje na kompleksiranje i obrazovanju oktaedarskih kompleksa.
- Izračunate vrednosti molarnog energetskog sadržaja za navedene apsorpcione maksimume su:  $160,89 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  za jedinjenje Cu-CMD, odnosno  $171,49 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  za jedinjenje Cu-DS, što odgovara energiji vidljive oblasti spektra za zabranjeni  $d \rightarrow d$  prelaz, dok su energije cepanja kristalnim poljem 1,74 (eV) za jedinjenje Cu-CMD, odnosno 1,83 (eV) za jedinjenje Cu-DS. Ovakve vrednosti ukazuju na tetragonalno deformisane komplekse oktaedarske koordinacije.

- Stehiometrija kompleksa je slična: za kompleks bakra se može prikazati kao:  $\text{Cu(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2$  i  $\text{Cu(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2$ , a za ona jedinjenja kobalta kao:  $\text{Co(II)}\cdot(\text{CMD})_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_2$  i  $\text{Co(II)}\cdot\text{DS}\cdot(\text{H}_2\text{O})_2$ .
- Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR su potvrdile uspešnost sinteze kompleksa Cu i Co sa CMD i DS. Na osnovu razlike u frekvenciji traka  $\nu_{\text{as}}$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$  vibracija, utvrđeno je da se karboksilna grupa CMD ponaša, verovatno, kao bidentatni ligand. Delokalizacija elektrona unutar okruženja bakra i kobalta nije potpuna, tako da je jedna CO veza karboksilne grupe pretežno dvostruka, a druga jednostruka, što ukazuje nešto povećana vrednost razlike u frekvenciji ovih vibracija. Koordinaciona sfera metala dopunjena je sa dva koordinirana molekula vode istog tipa, koji su uključeni u obrazovanje slabih vodonikovih veza: procenjeno  $\text{O}_w\dots\text{O}$  rastojanje je 280 pm kod Cu-CMD kompleksa.  ${}^4\text{C}_1$  konformacija  $\alpha$ -D-glukopiranoznog prstena CMD se ne menja tokom sinteze.
- Sličnost FTIR spektara DS u formi natrijumove soli i njegovih jedinjenja sa jonima bakra i kobalta ukazuje na sličnu strukturu, tj. da su ova jedinjenja pretežno jonskog karaktera, sa zadržanim ekvatorijalnim položajem sulfo grupa i nepromenjenom  ${}^4\text{C}_1$  konformacijom  $\alpha$ -D-glukopiranoznog prstena, kao u polaznom DS. Upoređivanje FTIR spektara snimljenih na sobnoj temperaturi i LNT omogućilo je jasnu detekciju traka libracija koordiniranih molekula vode, što potvrđuje da su joni metala u okruženju 6 atoma kiseonika od kojih su 4 iz dve  $-\text{SO}_3^-$  iste glukopiranozne jedinice DS, a dva od dva koordinirana molekula vode.
- Razvijeni su postupci sinteze AgNPs sa CMD, DS kao i ekstraktom *Fumaria officinalis* L. Na formiranje AgNPs u svim ovim slučajevima je ukazala promena boje reakcione smeše u toku sinteze od bezbojne do žućkasto-bron boje kao i promene u UV oblasti koje ukazuju na interakcije  $\text{Ag}^+$  jona sa CMD, DS i fitohemikalijama ekstrakta. Formiranje AgNPs potvrdila je traka od SPR prelaza Vis oblasti apsorpcionog spektra na oko 420 nm kod AgNPs-CMD i AgNPs-DS, a kod AgNPs-E oko 436 nm. Procenjena veličina čestica određena na osnovu položaja SPR trake bila bi u području od 20 do 40 nm. Čestice su pokazale

agregativnu stabilnost u ispitivanim vremenskim periodima (15 dana do 3 meseca).

- Rezultati ispitivanja primenom metode UV-Vis pokazuju da je apsorbancija za jedinjenje sa molskim odnosom  $\text{AgNO}_3$  : CMD  $\sim 1:2$  veća nego u slučaju sa molskim odnosom 1:1, što znači da se kod ovog molskog odnosa dobija veća količina AgNPs. Formiranje AgNPs-E na temperaturi ključanja se završava brže u odnosu na sintezu na sobnoj temperaturi, a veličina čestica je (18 nm) nešto manja u odnosu na one sintetisane na sobnoj temperaturi.
- Primenom metode GPC je zaključeno da u sintezi AgNPs-CMD učestvuje frakcija CMD srednje molarne mase 107 216 g/mol. Ovi manji oligomeri CMD, zajedno sa drugom frakcijom, predstavljaju optimalni ligand za kompleksiranje sa Ag, dajući AgNPs-CMD srednje molarne mase 113 191 g/mol.
- SEM mikrografi pokazuju da dominiraju pojedinačne sferne čestice AgNPs-CMD i AgNPs-DS, veličine 20-40 i 10-60 nm respektivno, koje nisu u direktnom kontaktu iako su primećeni i veći agregati. AgNPs-E mikrografi pokazuju nepravilne sferne čestice sa prosečnom veličinom 25 nm, što potvrđuje nalaze dobijene primenom metode UV-Vis, koje se često se aglomerišu u male agregate.
- Kod sva tri tipa AgNPs rezultati XRD analize su pokazali postojanje površinski centrirane kubne rešetke AgNPs na osnovu vrednosti  $2\theta$  pikova na  $38^\circ$ ,  $44.5^\circ$  i  $64.5^\circ$  koji definišu 111, 200 i 220 ravni ove rešetke. XRD profil AgNPs-CMD sadrži i pik na  $29^\circ$  od CMD koji je prisutan i u difraktogramu CMD, što potvrđuje uspešnost sinteze. Prosečna veličina AgNPs kristala određena je prema Scherrerovoj jednačini i iznosi:  $40 \pm 4$  nm kod AgNPs-DS. Kod AgNPs-E veličina kristalita sintetisanih na sobnoj temperaturi i temperaturi ključanja su  $20 \pm 1$  nm i  $18 \pm 1$  nm, respektivno.
- Metodom EDX izvršeno je kvalitativno i kvantitativno određivanje srebra uključenog u formiranje AgNPs-DS i AgNPs-E. Snažni signali koji odgovaraju elementarnom srebru na oko 3 eV potvrdili su postojanje srebra u oba slučaja. Slabiji signali koji odgovaraju S, Na (iz Na soli DS) potvrdili su formiranje AgNPs kao deo AgNPs-DS. Kod oba jedinjenja primećeni su i niži signali koji su karakteristični za C i O, što dodatno potvrđuje formiranje AgNPs sa ovim

agensima. Kod AgNPs-E sadržaj srebra metodom EDX je određen u uzorcima AgNPs sintetisanim na sobnoj i temperaturi ključanja i iznosi prosečno 35 % i 70 %, respektivno.

- Spektar strukturne korelacije primenom metode FTIR spektroskopije u oblasti funkcionalnih grupa potvrdile su ne samo uspešnost sinteze AgNPs, već i postojanje sličnih interakcija u  $O_h$  okruženju između CMD i DS sa AgNPs, kao kod odgovarajućih kompleksa bakra i kobalta sa ovim ligandima. Ovo znači da postoje jake interakcije između Ag i dva O atoma iz  $-\text{COO}^-$  grupe, tj. na koordinaciju jona srebra sa karboksilnom grupom, dok bi u slučaju AgNPs-DS to bile pretežno interakcije jonske prirode sulfo grupa sa srebrom.
- Tokom sinteze ne dolazi do promene  $^4\text{C}_1$  konformacija  $\alpha$ -D-glukopiranoznog prstena karboksimetil dekstrana i DS, ali se kod AgNPs-DS menja konformacija sulfo grupe od ekvatorijalne do aksijalne pozicije.
- Analiza FTIR spektra AgNPs-E pokazala je da molekuli koji sadrže funkcionalne grupe sa kiseonikom ili azotom kao NH, (NH)C=O, CNO, C-O-C i OH grupu imaju ulogu u redukciji i stabilizaciji AgNPs-E. To znači da jedinjenja koja stabilizuju AgNPs mogu biti polifenoli, flavonoidi, triterpenoidi, proteini, organske kiseline ili polisaharidi. Upoređenje spektara nedijaliziranog i dijaliziranog uzorka, pokazuje da u spektru uzorka koji je dijaliziran nema trake oko  $1384\text{ cm}^{-1}$ , što jasno ukazuje da ona potiče od zaostalih nitratnih jona.
- Predložen je model globalne strukture AgNPs sa CMD, DS i E, koji pretpostavlja postojanje tankog omotača organskih supstanci oko AgNPs, vezanih jakim jonskim ili koordinativnim vezama sa površinskim jonima srebra, koji je razlog stabilnosti čestica zbog međusobnog odbijanja.
- Sintetizovane nanočestice AgNPs-E, AgNPs-DS i AgNPs-CMD pokazale su antimikrobnu aktivnost prema analiziranim test mikroorganizmima. Za razliku od AgNPs-E koji je pokazao antimikrobnu aktivnost kod svih ispitivanih uzoraka, AgNPs-DS i AgNPs-CMD nisu pokazale aktivnost na gljivični soj *C. albicans*, a AgNPs-CMD i na *P. aeruginosa* u koncentraciji od 0,5 mg/ml. Ovako dobijene nanočestice srebra, zbog svoje stabilnosti i očuvane antimikrobne aktivnosti, mogu imati veoma široku primenu u raznim granama hemijske industrije.

- Razvijeni netoksični postupci sinteze kompleksa Cu i Co sa CMD i DS kao i AgNPs sa CMD, DS i zeleni postupak sinteze AgNPs-E sa tehnološkog aspekta su važni; ova jedinjenja imaju potencijalnu primenu u biomedicinskoj oblasti, a jednostavni postupci imaju mnoge prednosti, kao što su mali troškovi, kompatibilnost za medicinsku i farmaceutsku primenu, kao i izradu drugih komercijalnih proizvoda (veterina, kozmetika, tekstil, prehrambena industrija itd.).

## **6. LITERATURA**



Abdel-Mohsen A. M., Hrdina R., Burgert L., Krylová G., Abdel-Rahman R. M., Krejčová A., Steinhart M., Beneš L. (2012). Green synthesis of hyaluronan fibers with silver nanoparticles, *Carbohydrate polymers* 89(2): 411-422

Abu Bakar N. H. H., Ismail J., Abu Bakar M. (2007). Synthesis and characterization of silver nanoparticles in natural rubber, *Materials Chemistry and Physics* 104(2): 276–283.

Agotegaray M. A., Boeris M. A., Quinzani O. V. (2010). Significant anti-inflammatory properties of a copper(II) fenoprofenate complex compared with its parent drug: Physical and chemical characterization of the complex, *Journal of Brazilian Chemical Society* 21(12): 2294-2301.

Agotegaray M. A., Dennehy M., Boeris M. A., Grela M. A., Burrow R. A., Quinzani O. V. (2012b). Therapeutic properties, SOD and catecholase mimetic activities of novel ternary copper(II) complexes of the anti-inflammatory drug Fenoprofen with imidazole and caffeine, *Polyhedron* 34(1): 74-83.

Ahmad M. B., Lim J. J., Shameli K., Ibrahim N. A., Tay M. Y. (2011). Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization, *Molecules* 16(9): 7237-7248.

Aihara N., Torigoe K., Esumi K. (1998). Preparation and characterization of gold and silver nanoparticles in layered laponite suspensions, *Langmuir* 14(17): 4945-4949.

Ajiboye S. I., Brown D. R. (1990). Electron spin resonance study of soluble copper(II)-cellulose complexes, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 86(1): 65-68.

Amooghaie R., Saeri M. R., Azizi M. (2015). Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles, *Ecotoxicology and environmental safety* 120: 400-408.

Andrews J. M. (2005). BSAC standardized disc susceptibility testing method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56(1): 60-76.

Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II, *Botanical Journal of the Linnean Society* 141(4): 399-436.

- Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., Kenny J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review, *Polymer Degradation and Stability* 95(11): 2126–2146.
- Bankura K. P., Maity D., Mollick M. M., Mondal D., Bhowmick B., Bain M. K., Chattopadhyay D. (2012). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium, *Carbohydrate polymers* 89(4): 1159-1165.
- Bao X. F., Zhen Y., Ruan L., Fang J. N. (2002). Purification, characterization, and modification of T lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50(5): 623-629.
- Bar H., Bhui D. K., Sahoo G. P., Sarkar P., De S. P., Misra A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*, *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* 339(1): 134-139.
- Barker S. A., Bourne E. J., Stacey M., Whiffen D. H. (1953). Infra-red absorption spectra of dextran and other polyglucosans, *Chemistry & Industry* 9: 196-197.
- Bartkowiak A., Jezierska J., Spychaj T. (1998). An EPR study of polysaccharide copper(II) complexes in composite dextran/epichlorohydrin gels, *Polymer Bulletin* 41(2): 199-206.
- Basuny M., Ali I. O., El-Gawad A. A., Bakr M. F., Salama T. M. (2015). A fast green synthesis of Ag nanoparticles in carboxymethyl cellulose (CMC) through UV irradiation technique for antibacterial applications, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 75(3): 530-540.
- Bednar B. (2014). Sinteza metalnih nanočestica u graničnom sloju elektrolita i plazme, Fakultet tehničkih nauka, Novi Sad, 14-15.
- Berglund B., Lindgren J., Tegenfeldt J. (1978). On the correlation between deuterium quadrupole coupling constants, O-H and O-D stretching frequencies and hydrogen bond distances in solid hydrates, *Journal of Molecular Structure* 43(2): 179-191.
- Berry C. C., Wells S., Charles S., Curtis A. S. G. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro, *Biomaterials* 24(25): 4551-4557.

- Bhainsa K. C., D'Souza S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*, *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 47(2): 160-164.
- Bhattacharya R., Mukherjee P. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(11): 1289–1306.
- Bin Ahmad M., Lim J. J., Shameli K., Ibrahim N. A., Tay M. Y. (2011). Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization, *Molecules* 16(9): 7237-7248.
- Bindhu M. R., Umadevi M. (2013). Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using *Hibiscus cannabinus* leaf extract and its antimicrobial activity, *Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy* 101: 184-190.
- Boxall A. B. A., Chaudhry Q., Sinclair C., Jones A., Aitken R., Jefferson B., Watts C. (2007). Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles, *Central Science Laboratory, Department of the Environment and Rural Affairs, London, UK*, pp. 89.
- Cakić M., Glišić S., Nikolić G., Nikolić G. M., Cakić K., Cvetinov M. (2016). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure* 1110: 156-161.
- Cakić M., Nikolić G., Cvetković D., Ilić Lj. (2007). Kompleksi Fe(III) sa oligosaharidima-antianemici, *Tehnološki fakultet, Leskovac*.
- Cakić M., Nikolić G., Ilić Lj., Stanković S. (2005). Synthesis and FTIR characterization of some dextran sulphates, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 1(2): 74-78.
- Cakić M., Mitić Z., Nikolić G., Savić I., Savić I. M. (2013). Design and optimization of drugs used to treat copper deficiency, *Expert opinion on drug discovery* 8(10): 1253-1263.
- Cakić M., Mitić Ž., Nikolić G. S., Ilić L., Nikolić, G. M. (2008). The investigations of bioactive copper(II) complexes with reduced low-molar dextran, *Journal of Spectroscopy* 22(2-3): 177-185.
- Caswell K. K., Bender C. M. Murphy C. J. (2003). Seedless, surfactantless wet chemical synthesis of silver nanowires, *Nano Letters* 3(5): 667-669.
- Chairam S., Poolperm C., Somsook E. (2009). Starch vermicelli template assisted synthesis of size/shape-controlled nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 75(4): 694–704.

Chairam S., Somsook E. (2008). Starch vermicelli template for synthesis of magnetic iron oxide nanoclusters, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320(15): 2039–2043.

Chaki N. K., Sharma J., Mandle A. B., Mulla I. S., Pasricha R., Vijayamohan K. (2004). Size dependent redox behavior of monolayer protected silver nanoparticles (2–7 nm) in aqueous medium, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6(6): 1304-1309.

Chandran S. P., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A., Sastry M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract, *Biotechnology progress* 22(2): 577-583.

Chen D. H., Huang Y. W. (2002). Spontaneous formation of Ag nanoparticles in dimethylacetamide solution of poly(ethylene glycol), *Journal of Colloid Interface Science* 255(2): 299-302.

Chudobova D., Cihalova K., Ruttkay-Nedecky B., Kopel P., Zurek M., Bastl K., Kizek R. (2013a). Use of the silver phosphate nanoparticles (SPNPs) for their antimicrobial effect on bacterial strains, 18-10.

Chudobova D., Nejd L., Gumulec J., Krystofova O., Rodrigo M. A. M., Kynicky J., Kizek R. (2013b). Complexes of silver(I) ions and silver phosphate nanoparticles with hyaluronic acid and/or chitosan as promising antimicrobial agents for vascular grafts, *International journal of molecular sciences* 14(7): 13592-13614.

Clearfield A., Reibenspies J., Bhuvanesh N. (2008). *Principles and Applications of Powder Diffraction*, John Wiley and Sons, Ltd.

Cotton F. A., Wilkinson G. (1988). *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Interscience, New York, [a] str. 483; [b] str. 697–702; [c] 724–731; [d] 741–745; [e] 755–774; [f] 597–601.

Cozzoli P. D., Comparelli R., Fanizza E., Curri M. L., Agostiano A., Laub D. (2004). Photocatalytic synthesis of silver nanoparticles stabilized by tio<sub>2</sub> nanorods: a semiconductor/metal nanocomposite in homogeneous nonpolar solution, *Journal of the American Chemical Society* 126(12): 3868-79.

Crichton R. R. (2012). *Biological Inorganic Chemistry: A New Introduction to Molecular Structure and Function*. Elsevier.

Daniel-da-Silva A. L., Fateixa S., Guiomar A. J., Costa B. F. O., Silva N. J. O., Trindade T., Goodfellow B. J., Gil A. M. (2009). Biofunctionalized magnetic hydrogel nanospheres of magnetite and k-carrageenan, *Nanotechnology* 20(35): 355602.

Darwis D., Stasica P., Razzak M. T., Rosiak J. M. (2002). Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus, *Radiation Physics and Chemistry* 63(3): 539-542.

de Aragão A. P., de Oliveira T. M., Quelemes P. V., Perfeito M. L. G., Araújo M. C., Santiago J. D. A. S., da Silva D. A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity, *Arabian Journal of Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.014>.

Defazio S., Cini R. (2002). Synthesis, X-ray structure and molecular modelling analysis of cobalt(II), nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of the widely used anti-inflammatory drug meloxicam, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (9): 1888-1897.

Delić D. (2011). *Toxicity of silver nanoparticles in duckweed (Lemna minor L.)*, Doctoral dissertation, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Dendrinou-Samara C, Tsotsou G., Ekateriniadou L. V., Kortsaris A. H., Raptopoulou C. P., Terzis A., Kyriakidis D. A., Kessissoglou D. P. (1998). Anti-inflammatory drugs interacting with Zn(II), Cd(II) and Pt(II) metal ions, *Journal of Inorganic Biochemistry* 71(3): 171-179.

Devi J. S., Bhimba B. V. (2012). Anticancer Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by the Seaweed *Ulva lactuca* In vitro. 1: 242.

Dhand V., Soumya L., Bharadwaj S., Chakra S., Deepika B., Sreedhar B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity, *Materials Science and Engineering C* 58: 36-43.

Dimiza F., Papadopoulos A. N., Tangoulis V., Psycharis V., Raptopoulou C. P., Kessissoglou D. P., Psomas G. (2010). Biological evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs-cobalt(II) complexes, *Dalton Transactions* 39(19): 4517-4528.

Dimiza F., Perdih F., Tangoulis V., Turel I., Kessissoglou D., Psomas G. (2011). Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac Synthesis, Structure, DNA- and albumin-binding, *Journal of Inorganic Biochemistry* 105(3): 476-489.

Dipankar C., Murugan S. (2012). The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98: 112-119.

Drago R. (1981). *Physical methods in chemistry* 1, 2. Mir, Moskva.

Dragojević M., Popović M., Stević S., Šćepanović V. (2007). *Opšta hemija I*, 4. izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, [a] str. 354–358; [b] str. 372–373; [c] str. 374–376.

Dubas S. T., Wacharanad S., Potiyaraj P. (2011). Tuning of the antimicrobial activity of surgical sutures coated with silver nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 380(1): 25-28.

Đaković Lj., (1985), Koloidna hemija, Tehnološki fakultet, Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad.

Ebrahimnezhad A., Barzegar Y., Ghasemi Y., Berenjian A. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Alcea rosea* flower extract as a new generation of antimicrobials, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* (00): 2-2.

Ebrahimnezhad A., Ghasemi Y., Resou-Amin S., Barar J., Davaran S. (2012). Impact of Amino-Acid Coating on the Synthesis and Characteristics of Iron-Oxide Nanoparticles (IONs), *Bulletin of the Korean Chemical Society* 33(12): 3957-3962.

Esumi K., Suzuki A., Aihara N., Usui K., Torigoe K. (1998). Preparation of Gold Colloids with UV Irradiation Using Dendrimers as Stabilizer, *Langmuir* 14(12): 3157-3159.

Expert group on vitamins and minerals. (2002). *Draft review of copper*, EVM/99/19. Secretariat, ak Government, London, may.

Farrell N., (2003), „Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents“, u: J.A. Meyer, T.J. McCleverty (urednici), „Comprehensive coordination chemistry II, Vol. 9“, Elsevier, Oxford, UK, str. 809–840.

Faure C., Derre A., Neri W. (2003). Spontaneous Formation of Silver Nanoparticles in Multilamellar Vesicles, *Journal of Physical Chemistry B* 107(20): 4738-4746.

Feng Q. L., Wu J., Chen G. Q., Cui F. Z., Kim T. N., Kim J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research* 52(4): 662–668.

Filipović I., Lipanović S. (1982). *Opća i anorganska hemija*. Školska knjiga-Zagreb.

Foussard-Blanpin O., Cayron MA. (1988). Le cuivre en therapeutique; *Les Actualites Pharmaceutiques* no. 253: 67-69.

Garza-Navarro M. A., Aguirre-Rosales J. A., Llanas-Vázquez E. E., Moreno-Cortez I. E., Torres-Castro A., González-González V. (2013). Totally ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from aqueous dissolutions of polysaccharides, *International Journal of Polymer Science* 2013.

Ghaseminezhad S. M., Hamed S., Shojaosadati S. A. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: comparative study of their properties, *Carbohydrate polymers* 89(2): 467-472.

Gibson V. C., Marshall E. L. (2003). „Metal complexes as catalysts for polymerization reactions“, u: J.A. Meyer, T.J. McCleverty (urednici), „Comprehensive coordination chemistry II, Vol. 9“, Elsevier, Amsterdam, NL; Boston, USA, str. 411–446.

Glišić S., Cakić M., Nikolić G., Danilović B. (2015). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of carboxymethyl dextrane stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure* 1084: 345–351.

Glišić S., Nikolić G., Cakić M., Trutić N. (2015). Spectroscopic study of copper(II) complexes with carboxymethyl dextran and dextran sulphate, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 89(7): 1254-1262.

Glišić S., Stanojević Lj., Cvetković D., Zvezdanović J., Nikolić G., Cakić M., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced from *Fumaria officinalis* L. herba extract, *24<sup>th</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Book of Abstracts, MPCE 011, p.215. 11-14. September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia.

Gregory P. (2003). „Metal Complexes as speciality dyes and pigments“, u: J.A. Meyer, T.J. McCleverty (urednici), „Comprehensive coordination chemistry II, Vol. 9“, Elsevier, Oxford, UK, , str. 549–580.

Gutnikov G., Scott M. (2000). In *Encyclopedia of separation sciences*, Academic press, London.

Guzman M., Dille J., Godet S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine* 8(1): 37–45.

Hamblin M. R., Jori G. (2011). Photodynamic inactivation of microbial pathogens: Medical and environmental applications, Hamblin MR, Jori G (Eds.), From series:

Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology No. 11, The Royal Society of Chemistry, European Society for Photobiology, UK, ISBNs: 978-1-84973-144-7 (Hardback) & 978-1-84973-308-3 (Electronic).

Hamedi S., Ghaseminezhad S. M., Shojaosadati S. A., Shokrollahzadeh S. (2012). Comparative study on silver nanoparticles properties produced by green methods, *Iranian Journal of Biotechnology* 10(3): 191-197.

Henglein A. (1993). Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition, *The Journal of Physical Chemistry* 97(21): 5457-5471.

Horikoshi S., Sorpone N. (2013). Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications 1. Introduction to Nanoparticles Published Online: 26 APR DOI: 10.1002/9783527648122.ch1

Hornebecq V., Antonietti M., Cardinal T., Treguer-Delapierre M. (2003). Stable silver nanoparticles immobilized in mesoporous silica, *Chemistry of Materials* 15(10): 1993-1999.

Huang J., Li Q., Sun D., Lu Y., Su Y., Yang X., Hong J. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 18(10): 105104.

Iakovidis I., Delimaris I., Piperakis S. M. (2011). Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach, *Molecular biology international* 2011.

Ivanov I., Vrancheva R., Marchev A., Petkova N., Aneva I., Denev P., Pavlov A. (2014). Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(2): 296-306.

Jain J., Arora S., Rajwade J. M., Omray P., Khandelwal S., Paknikar K. M. (2009). Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use, *Molecular Pharmacology* 6(5): 1388-1401

Jain P., Pradeep T. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter, *Biotechnology and Bioengineering* 90(1): 59-63.

Jeziarska J., Kolarz B.N., Pawłow B., Trochimeczuk A. (1997). Electron paramagnetic resonance studies on interactions between difunctionalized polymers and copper(II), *Reactive and Functional Polymers* 33(2-3): 127-136.



Jiang Z. J., Liu C. Y., Sun L.-W. (2005). Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres, *Journal of Physical Chemistry B* 109(5): 1730-1735.

Johans C., Clohessy J., Fantini S., Kontturi K., Cunnane V. J. (2004). Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid-liquid interface. *Electrochemistry Communications*, 4(3): 227-230.

Jørgensen C. K. (1954). Studies of absorption spectra. Some new transition group bands of low intensity, *Acta Chemica Scandinavica* 8(9): 1502-1512.

Jull A., Walker N., Parag V., Molan P., Rodgers A. (2008). Honey as adjuvant leg ulcer therapy trial collaborators. Randomized clinical trial of honey-impregnated dressings for venous leg ulcers. *British Journal of Surgery* 95(2): 175-182.

Kaličanin B., Nikolić R. (2011). The application of the potentiometric stripping analysis to determine traces of M(II) metals (Cu, Zn, Pb and Cd) in bioinorganic and similar materials. In *Wide Spectra of quality control*. InTech.

Kanmani P., Lim S. T. (2013). Synthesis and characterization of pullulan-mediated silver nanoparticles and its antimicrobial activities. *Carbohydrate polymers* 97(2): 421-428.

Kauffman G. B. (1987). „General historical survey to 1930“, u: G. Wilkinson (urednik), „Comprehensive coordination chemistry, Vol. 1“, Pergamon Press, Oxford, UK, str. 1–20.

Kennedy J. F., White C. A. (1983). Bioactive carbohydrates in chemistry, and biology, Ellis Horwood Limited, Chichester, England.

Kentaro M., Kotaro K. (1974). Flange cover mounting structure; Int C1 Fi6B9/02, Appl. No 287 67; Jap. Pat 120 62A2 (2000) dop. JpP120 626

Klaine S. J., Alvarez P. J. J., Batley G. E., Fernandes T. F., Handy R. D., Lyon D. Y., Mahendra S. Y., Mclaughlin M. J., Lead J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects, *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1825–1851.

Knetsch M. L. W., Koole L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles, *Polymers* 3(1): 340-366.

Komarneni S., Li D. S., Newalkar B., Katsuki H., Bhalla A. S. (2002). Microwave-Polyol Process for Pt and Ag Nanoparticles, *Langmuir* 18(15): 5959-5962.

Kouvaris P., Delimitis A., Zaspalis V., Papadopoulos D., Tsipas S.A., Michailidis N. (2012). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus unedo* leaf extract, *Materials Letters* 76: 18-20.

Krstić N.S. (2013). *Study of the interaction of M(II) biometal ions in model systems with pharmaceuticals and supplements type acids as potential ligands*. PhD Thesis. Faculty of Sciences and Mathematics Nish, Serbia.

Kumar V., Yadav S. K. (2009). Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(2): 151-157.

Kumar V., Yadov S. C., Yadav S. K. (2010). *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85(10): 1301-1309.

Kuo P. L., Chen W. F. (2003). Formation of silver nanoparticles under structured amino groups in pseudo-dendritic poly (allylamine) derivatives. *Journal of Physical Chemistry B* 107(41): 11267-11272.

Latif A., Rehman S., Afag S. H., Siddiqui N. (2012). "Physico-chemical and Phytochemical Evaluation of a *Fumaria officinalis* (Shahtra) Linn.-An important medicinal herbal drug", *Hippocratic journal of unani medicine* 7(2): 91-99.

Lawrance G. A. (2013). *Introduction to coordination chemistry*. John Wiley & Sons.

Leopold N., Lendl B. (2003). A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *Journal of Physical Chemistry B* 107(24): 5723-5727.

Lever A. P. B. (1987). *Inorganic electronic spektroskopy* 1, 2, Mir, Moskva 94-114

Lewis A. G. (1995). The biological importance of copper, Literature Review ICA Project No.223, British Columbia, CA 7-17.

Lihui X., Ruimin Z., Gracien E. B., Francis A. O. (2004). Synthesis of silver nanoparticles by EB irradiation, *Journal of Radiation Research and Radiation Processing* 22(2): 69-72.

Liu M., Yue X. L., Dai Z. F., Ma Y., Xing L., Zha Z., Liu S., Li Y. (2009). Novel thrombo-resistant coating based on iron-polysaccharide complex multilayers, *ACS Applied Materials & Interfaces* 1(1): 113-123.

Liu C., Lu J., Lu L., Liu Y., Wang F., Xiao M. (2010a). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1, *Bioresource Technology* 101(14): 5528-5533.

Liu J., He F., Gunn T. M., Zhao D., Roberts C.B. (2009). Precise seed-mediated growth and size-controlled synthesis of palladium nanoparticles using a green chemistry approach, *Langmuir* 25(12): 7116-7128.

Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K. H., Chiu J. F., Che C. M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5(4): 916-924.

Magudapatty G., Gangopaghyayrans P., Panigrahi B. K., Nair K. G. M., Dhara S. (2001). Electrical transport studies of Ag nanoparticles embedded in glass matrix, *Physica B: Condensed Matter* 299(1): 142-146.

Mähner C., Lechner M. D., Nordmeier E. (2001). Synthesis and characterization of dextran and pullulan sulphate, *Carbohydrate Research* 331(2): 203-208.

Maillard M., Giorgio S., Pileni M. P. (2002). Silver nanodisks, *Advanced Materials* 14(15): 1084-1086.

Maillard M., Giorgio S., Pileni M. P. (2003). Tuning the size of silver nanodisks with similar aspect ratios: Synthesis and optical properties, *Journal of Physical Chemistry B* 107(11): 2466-2470.

Marambio-Jones C., Hoek E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research* 12(5): 1531-1551.

Marković D., Cakić S., Nikolić G. (1998). Hromatografija, Teorijske osnove sa praktikumom, Tehnološki fakultet, Leskovac.

McConnell J. C., McConnell R. M., Hossner L. R. (1993). Ultraviolet spectra of acetic acid, Glycine and glyphosate, *Journal of the Arkansas Academy of Science*, Proceeding 47(1): 73-76.

McFarland A. D., Duyne R. P. V. (2003). Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity, *Nanoletters*, 3(8): 1057- 1062.

Mentus S., Mioč U. (1992). "Odabrane metode fizičko-hemijske analize", Fakultet za fizičku hemiju, p 41-69, p 113-121, p. 193-208.

Milić N. (1998). Neorganska kompleksna i klasterna jedinjenja, PMF, Kragujevac.

Milosavljević S. (1994). "Strukturne instrumentalne metode", Hemijski fakultet, Beograd, 39-107.

Mišović J., Ast T. (1989). Instrumentalne metode hemijske analize, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, 203-209.

Mitić Ž., Nikolić G. S., Cakić M. (2008). Development of ATR-FTIR Microspectroscopy for Analysis of Bioactive Copper(II)-Polysaccharide Complexes „Shedding Light of Disease“ Optical Diagnosis for the New Millennium, Conference SPEC 2008, (Sao Jose dos Campos, Sao Paulo, Brazil, 86-88).

Mitić Ž. (2009). *Sinteza i spektar strukturne korelacije kompleksa nekih biometala sa dekstranom i pululanom*, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, doktorska disertacija.

Mitić Ž., Cakić M., Nikolić G. M., Nikolić R., Nikolić G. S., Pavlović R., Santaniello E. (2011). Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper(II)-polysaccharide pullulan complexes by UV-Vis, ATR-FTIR, and EPR, *Carbohydrate research* 346(3): 434-441.

Mitić Ž., Nikolić G. S., Cakić M., Nikolić R., Ilić L. (2007). Synthesis and spectroscopic characterization of copper (II)-dextran complexes. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 81(9): 1433-1437.

Mitić Ž., Nikolić G. S., Cakić M., Premović P., Ilić Lj. (2009). FTIR spectroscopic characterization of Cu(II) coordination compounds with exopolysaccharide pullulan and its derivatives, *Journal of Molecular Structure* 924: 264-273.

Mochochoko T., Oluwafemi O. S., Jumbam D., Songca S. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth. *Carbohydrate Polymers* 98(1): 290-294.

Mohanta Y. K., Behera S. K. (2014). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by *Streptomyces* sp. SS2. *Bioprocess and biosystems engineering* 37(11): 2263-2269.

Mohanta Y. K., Panda S. K., Bastia A. K., Mohanta T. K. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Protium serratum* and investigation of their potential impacts on food safety and control. *Frontiers in microbiology*, 8.

Mohanta Y. K., Panda S. K., Biswas K., Tamang A., Bandyopadhyay J., De D., Bastia A. K. (2016a). Biogenic synthesis of silver nanoparticles from *Cassia fistula*

(Linn.): in vitro assessment of their antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities, *IET nanobiotechnology* 10(6): 438-444.

Mohanta Y. K., Singdevsachan S. K., Parida, U. K., Panda S. K., Mohanta T. K., Bae H. (2016b). Green synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using wild medicinal mushroom *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India, *IET nanobiotechnology* 10(4): 184-189.

Monteiro D. R., Gorup L. F., Takamiya A. S., Ruvollo-Filho A. C., Camargo E. R., Barbos D. B. (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver, *International Journal of Antimicrobial Agents* 34(2): 103-110.

Moreno-Garrido I., Perez S., Blasco J. (2015). Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae, *Marine Environmental Research* 111: 60-73.

Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramírez J. T., Yacaman M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10): 2346-2353.

MubarakAli D., Thajuddin N., Jeganathan K., Gunasekaran M. (2011). Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85(2): 360-365.

Nadagouda M. N., Varma R. S. (2007). Synthesis of thermally stable carboxymethyl cellulose/metal biodegradable nanocomposites for potential biological applications, *Biomacromolecules* 8(9): 2762-2767.

Nagajyothi P. C., Lee K. D. (2011). Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Dioscorea batatas rhizome* extract and evaluation of their antimicrobial activities, *Journal of nanomaterials*, 2011: 49.

Naik R. R., Stringer S. J., Agarwal G., Jones S. E., Stone M. O. (2002). Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nature materials* 1(3): 169-172.

NanoComposix [Online]. Available: <http://nanocomposix.eu/>.

Nayak D., Pradhan S., Ashe S., Rauta P. R., Nayak B. (2015). Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431 carcinoma. *Journal of colloid and Interface science*, 457: 329-338.

Netala V. R., Bethu M. S., Pushpalatha B., Baki V. B., Aishwarya S., Rao J. V., Tartte V. (2016). Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities, *International journal of nanomedicine* 11: 5683.

Nikolić G. (2001). *Sinteza, fizičko-hemijska svojstva i struktura kompleksa gvožđa(III) sa oligosaharidima*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Leskovac.

Nikolić G., Cakić M., Glišić S., Cvetković D., Mitić Ž., Marković D. (2016). Study of green nanoparticles and biocomplexes based on exopolysaccharide by modern Fourier transform spectroscopy, (in press) Chapter in book: "Fourier transforms", ISBN: 978-953-51-4927-9, Publisher: InTech, November 2016, Available from: <http://www.intechopen.com>

Nikolić M. V., Mijajlović M. Ž., Jevtić V. V., Ratković Z. R., Radojević I. D., Čomić Lj. R., Novaković S. B., Bogdanović G. A., Trifunović S. R., Radić G. P. (2014). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper (II) complex with S-methyl derivative of thiosalicylic acid, *Polyhedron* 79: 80-87.

Nikolić R. S., Nikolić G. M., Đorđević D. M., Krstić N. S. (2010). Koordinaciona hemija - Osnovi, Vežbe i Drugi Oblici Nastave, PMF-Niš.

Nikolić G. S., Cakić M., Mitić Ž., Ilić B., Premović P. (2009). Attenuated total reflectance-fourier transform infrared microspectroscopy of copper (II) complexes with reduced dextran derivatives. *Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry* 83(9): 1520-1525.

Nikolić G. S., Cakić M., Mitić Ž., Ilić Lj. (2008). Deconvoluted Fourier-transform LNT-IR study of coordination copper (II) compounds with dextran derivatives, *Russian Journal of Coordination Chemistry* 34(5): 322-328.

Nikolić R., Nikolić G., Đorđević D., Krstić N. (2010). Koordinaciona hemija, Prirodno-matematički fakultet, Niš.

O'Brien P., Pickett N. (2003). „Coordination complexes as precursors for semiconductor films and nanoparticles“, u: J.A. Meyer, T.J. McCleverty (urednici), „Comprehensive coordination chemistry II, Vol. 9“, Elsevier, Oxford, UK, str. 1005–1063.

Pal S., Tak K. Y., Song M. J. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiolog*, 73: 1712–1720.

Palacios E. G., Juárez-López G., Monhemius A. J. (2004). Infrared spectroscopy of metal carboxylates: II. Analysis of Fe(III), Ni and Zn carboxylate solutions, *Hydrometallurgy* 72(1): 139-148.

Panáček A., Kolář M., Večeřová R., Pucek R., Soukupová J., Kryštof V., Hamal P., Zbořil R., Kvítek L. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30: 6333–40.

Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V. K., Nevěčná T., Zbořil R. (2006). Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 110: 16248-16253.

Panov V. P., Zhbankov R. G. (1976). Conformations of Sugars, Nauka i Tekhnika, Minsk BY.

Panov V. P., Zhbankov R. G. (1988). Intra- and intermolecular interactions in carbohydrates, Nauka i Tekhnika, Minsk, Belarus.

Park J. H., Im K. H., Lee S. H., Kim D. H., Lee D.Y., Lee Y.K., Kim K. M., Kim K. N. (2005). Preparation and characterization of magnetic chitosan particles for hyperthermia application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1): 328-333.

Pejov Lj., Šoptrajanov B., Jovanovski G. (2001). Very low HOH bending frequencies. II. Quantum chemical study of the water bending potential in compounds of the MKPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O type, *Journal of Molecular Structure*, 563-564 pp.321-327.

Pettinari C., Marchetti F., Martini D. (2003). „Metal Complexes as hydrogenation catalysts“, u: J.A. Meyer, T.J. McCleverty (urednici), „Comprehensive coordination chemistry II, Vol.9“, Elsevier, Oxford, UK, str. 75–139.

Philip D. (2010). Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A* 75(3): 1078-1081.

Prinz E. M., Eggers R., Lee H. H., Steinfeld U., Hempelmann R. (2010). Synthesis of drug loaded magnetic nanoparticles and their uptake into immune cells, *In Journal of Physics: Conference Series* 200(12): 122009.

Puntarić E. (2014). Utjecaj nanočestica srebra na vodenu leću, Prirodno-matematički fakultet, Zagreb, 1-3.

Quelemes P. V., Araruna F. B., de Faria B. E., Kuckelhaus S. A., da Silva D. A., Mendonça R. Z., Leite J. R. S. (2013). Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles, *International journal of molecular sciences* 14(3): 4969-4981.

Radzig M. A., Nadtochenko V. A., Koksharova O. A., Kiwi J., Lipasova V. A., Khmela I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102: 300-306.

Ramsten J. J. (2014). What is Nanotechnology? Applied Nanotechnology, Second Edition. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-3189-3.00001-4>.

Raveendran P., Fu J., Wallen S. L. (2006). A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles. *Green Chemistry*, 8(1): 34-38.

Rehm B. H. A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications, applied and industrial microbiology, *Nature Reviews Microbiology* 8(8): 578- 592.

Ricketts C. R. (1952a). Interaction of dextran and fibrinogen. *Nature*, 169(4310): 970-970.

Ricketts C. R. (1952b). Dextran sulphate-a synthetic analogue of heparin, *Biochemical Journal* 51(1): 129-133

Rose S. (2007). Vitamins and minerals-How to get the nutrients your body needs. Bounty Books, Octopod Publishing Groups Ltd. London UK

Sabri M. A., Umer A., Awan G. H., Hassan M. F., Hasnain A. (2016). Selection of suitable biological method for the synthesis of silver nanoparticles, *Nanomaterials and Nanotechnology* 6: 29.

Saleh M. M., Khalet M. I. (2013). Synthesis of isatin derivatives considering Pfitzinger Reactions., Part I, *International Journal of Scientific Research* 4(8): 2083-2089.

Sarwat F., Qader S. A. U., Aman A., Ahmed N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, *International Journal of Biological Sciences* 4(6): 379-386.



- Sathishkumar M., Sneha K., Won S. W., Cho C. W., Kim S., Yun Y. S. (2009). *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73(2): 332-338.
- Savić I., Nikolić G., Savić I., Cakić M. (2010). Development and validation of gel-chromatographic and spectrophotometric methods for quantitative analysis of bioactive copper complexes in new antihypocupremical formulations, *Acta Chromatographica* 22(3): 375-390.
- Schraum-Thirl N., Freiskurn, R., Kettner M. (1971). *Arzeimforshchung*, 21: 1389.
- Se-Hui J., Jae-Wen J., Kwon-So H. (2007). Application of NHS-dextran-based Protein Arrays for Analysis of Blood Protein with a spectral SPR Biosensor, *Biochip Journal* 1(3): 213-217.
- Shankar S. S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. (2004). Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth, *Journal of colloid and interface science* 275(2): 496-502.
- Shankar S. S., Rai, A., Ahmad, A., Sastry M., (2005), Controlling the optical properties of lemongrass extract synthesized gold nanotriangles and potential application in infrared-absorbing optical coatings, *Chemistry of Materials* 17(3): 566-572.
- Shankar S. S., Rai A., Ankamwar, B., Singh A., Ahmad A., Sastry M. (2004). Biological synthesis of triangular gold nanoprisms, *Nature materials* 3(7): 482-488.
- Sharma V. K., Yngard R. A., Lin Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science* 145: 83-96.
- Sharma N. C., Sahi S. V., Nath S., Parsons J. G., Gardea-Torresde J. L., Pal T. (2007). Synthesis of plant-mediated gold nanoparticles and catalytic role of biomatrix-embedded nanomaterials, *Environmental science & technology* 41(14): 5137-5142.
- Shchukin D. G., Radtchenko I. L., Sukhorukov G. B. (2003). Photoinduced reduction of silver inside microscale polyelectrolyte capsules. *ChemPhysChem* 4: 1101-1103.
- Shevchenko L. I., Lugovaya Z. A., Tolmachev V. N. (1985). Study of the complexing properties of the dextran carboxymethyl ether with transition metal ions in solutions. *Polymer Science USSR* 27(9): 2242-2247.
- Shipway A. N., Lahav M., Willner I. (2000). Nanostructured gold colloid electrodes, *Advanced Materials* 12(13): 993-998.

- Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 18: 225103-225112.
- Silverberg M., Diehl S. V. (1987). *Biochemical Journal* 248: 715.
- Simonsen L. O., Harbak H., Bennekou P. (2012). Cobalt metabolism and toxicology-a brief update, *Science of the Total Environment* 432: 210-215.
- Slawson R. M.; Van Dyk M. I., Lee H., Trevors J. T. (1992). Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms, *Plasmid* 27: 72-79.
- Sondi I., Salopek B. (2004). Uticaj srebra na *E.coli*, *Journal of Colloid and Interface Science* 27(5): 17-18.
- Stasica P., Rosiak J. M., Ciach M., Radek M. (2000). Approach to construct hydrogel intervertebral discs implants-experimental and numerical investigations. *Engineering of Biomaterials* 3: 9-14.
- Stevens P. F., *Fumarioiceae*. Angiosperm Phylogeny Website.
- Stojanović Ž., Jeremić K., Jovanović S., Nierling W. (2009). Oblik i veličina makromolekula karboksimetil dekstrana u razblaženim rastvorima, *Hemijska industrija* 63(6): 593-602.
- Šoptrajanov B., Jovanovski G., Pejov Lj. (2002). Very low H-O-H bending frequencies. III. Fourier transform infrared study of cobalt potassium phosphate monohydrate and manganese potassium phosphate monohydrate, *Journal of Molecular Structure* 613: 47.
- Tamboli D. P., Lee D.S. (2013). Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly-synthesized silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria, *Journal of Hazardous Materials* 260: 878-884
- Tao K., Song S., Ding J., Dou H., Sun K. (2011). Carbonyl groups anchoring for the water dispersibility of magnetite nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, 289(4): 361-369.
- Tita B., Stefanescu M., Tita D. (2011). Complexes of Anti-inflammatory Non-steroidal Drugs from Carboxylic Acids Family 1. Synthesis and characterization of Zn(II) complex with Ibuprofen, *Revista de Chimie* 62(11): 1060-1064.
- Tolmachev V. N., Polovinkina L. I., Lugovaya Z.A. (1985). Study of the acid properties of carboxymethyl dextran. *Polymer Science USSR*, 27(2); 273-278.

Tóth E., Helm L., Merbach A. (2003) „Metal complexes as MRI contrast enhancement agents, u: J.A. Meyer, T.J. McCleverty (urednici), *Comprehensive coordination chemistry II*, Vol. 9“, Elsevier, Oxford, UK, str. 841–881.

Trajković V., Marković Z. (2010). Nanomedicina: Stanje i perspektiva. In book: *Biomaterijali*. Rakovic D., Uskoković D. (eds), Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauke i umetnosti, Beograd, 762-775.

Travan A., Pelillo C., Donati I., Marsich E., Benincasa M., Scarpa T., Semeraro S., Turco G., Gennaro R., Paoletti S. (2009). Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity, *Biomacromolecules* 10: 1429-1435.

Trindade, T., Daniel-Da-Silva A. L. (2011). Biofunctional composites of polysaccharides containing inorganic nanoparticles. In *Advances in Nanocomposite Technology*. InTech.

Tseng C. H., Wang C. C., Chen C. Y. (2006). Polypropylene fibers modified by plasma treatment for preparation of Ag nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B* 110: 4020-4029.

Tsiliou S., Kefala L. A., Perdih F., Turel I., Kessissoglou D. P., Psomas G. (2012). Cobalt(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid: Structure and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 48: 132-142.

Van Phu D., Duy N. N., Hien N. Q. (2013). Study of incorporation of silver nanoparticles onto PE-g-PAAc nonwoven fabric by  $\gamma$ -irradiation for water treatment, *Radiation Physics and Chemistry* 88: 90-94.

Vasko P. D., Blackwell J., Koenig J. L. (1971). Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part I: Identification of O-H and C-H related vibrational modes for D-glucose, maltose, cellobiose, and dextran by deuterium-substitution methods, *Carbohydrate Research* 19(3): 297-310.

Venediktov E. A., Padokhin V. A. (2008). Synthesis of silver nanoclusters in starch aqueous solutions, *Russian Journal of Applied Chemistry* 81(11): 2040-2042.

Venkatesan J., Kim S. K., Shim M. S. (2016). Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using marine algae *Ecklonia cava*, *Nanomaterials* 6(12): 235.

- Vigneshwaran N., Nachane R. P., Balasubramanya R. H., Varadarajan P. V. (2006) A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch, *Carbohydrate research* 341(12): 2012-2018.
- Vilchis-Nestor A. R., Sánchez-Mendieta V., Camacho-López M. A., Gómez-Espinosa R. M., Camacho-López M. A., Arenas-Alatorre J. A. (2008). Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract, *Materials Letters* 62(17): 3103-3105.
- Wang X. Q., Itoh H., Naka K., Chujo Y. (2003). Tetrathiafulvalene-assisted formation of silver dendritic nanostructures in acetonitrile. *Langmuir*, 19(15): 6242-6246.
- Watson L., Dallwitz M. J. (1992). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, information retrieval.
- Weder J. E., Dillon C. T., Hambley T. W., Kennedy B. J., Lay P. A., Biffin J. R., Davies N. M. (2002). Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized, *Coordination Chemistry Reviews* 232(1): 95-126.
- Wei D., Sun W., Qian W., Ye Y., Ma X. (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate research* 344(17): 2375-2382.
- World Health Organization. (2004). Manganese in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality.
- Xiang D. X., Chen Q., Pang L., Zhenga C. L. (2011). Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro, *Journal of Virological Methods*, 178: 137-142.
- Yamamoto T., Yin H. B., Wada Y., Kitamura T., Sakata T., Mori H., Yanagida S. (2004). Morphology-control in microwave-assisted synthesis of silver particles in aqueous solutions, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 77: 757-761.
- Yu D., Yam V. W.-W. (2005). Hydrothermal-induced assembly of colloidal silver spheres into various nanoparticles on the basis of HTAB-modified silver mirror reaction, *Journal of Physical Chemistry B* 109(12): 5497-503.
- Zhang J., Chen P., Sun C., Hu X. (2004). Sonochemical synthesis of colloidal silver catalysts for reduction of complexing silver in DTR system, *Applied Catalysis A: General* 266: 49-54.

Zhang K., Ai S., Xie J., Xu J. (2017). Comparison of direct synthesis of silver nanoparticles colloid using pullulan under conventional heating and microwave irradiation, *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* 47(6): 938-945.

Zhang L. Z., Yu J. C, Yip H. Y., Li Q., Kwong K. W., Xu A. W., Wong P. K. (2003). Ambient Light Reduction Strategy to Synthesize Silver 316.

Zhbankov R. G. (1972). Infrared spectra and structure of carbohydrates. Nauka i Tekhnika, Minsk, Belarus.

Zheng X. W., Zhu L. Y., Wang X. J., Yan A. H., Xie Y. (2004). A simple mixed surfactant route for the preparation of noble metal dendrites, *Journal of Crystal Growth* 260(1): 255-262.

Zheng X. W., Zhu L. Y., Yan A. H., Wang X. J., Xie Y. (2003). Controlling synthesis of silver nanowires and dendrites in mixed surfactant solutions. *Journal of Colloid Interface Science* 268(2): 357-61.

Жарский И. М., Новиков Г. И. (1988). Физические методы исследования в неорганической химии. Высшая школа, Москва.

## **BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA**

## Biografija

*Slobodan Lj. Glišić rođen je 4. maja 1988. godine u Leskovcu. Studije je upisao školske 2007/2008. godine na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, smer farmaceutsko-kozmetičko inženjerstvo. U četvrtoj godini osnovnih studija, 2010/2011. godine, proglašen je za najboljeg studenta ove visokoobrazovne ustanove. Diplomirao je 8. oktobra 2011. godine. Iste godine na Tehnološkom fakultetu upisao je master studije, smer farmaceutsko-kozmetičko inženjerstvo, koje je i završio 5. oktobra 2012, odbranivši master rad na temu "Razvoj i ispitivanje novih bioaktivnih kozmetičkih formulacija" sa ocenom 10. Tokom studiranja na master studijama ostvario je prosečnu ocenu 9,90. Godine 2012/2013. na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu upisao je doktorske studije na smeru tehnološko inženjerstvo. Od aprila 2013. godine, angažovan je kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na projektu „Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije”, evidencioni broj TR34012. Školske 2014/2015. godine angažovan je kao saradnik u nastavi na izvođenju vežbi iz predmeta matematika 1, a 2015/2016. na predmetu instrumentalne metode hemijske analize. Prethodne godine doktorskih studija završio je u roku sa prosečnom ocenom 10. Oblast njegovog naučnog interesovanja je oblast sinteze, karakterizacije i ispitivanje farmakološke aktivnosti kompleksa i nanočestica nekih jona metala sa derivatima polisaharida. Od posebnog značaja su jedinjenja polisaharida sa različitim biometalima, s obzirom na to da u svom sastavu sadrže polisaharid kao energetski izvor i bioelemente kao značajne faktore u biometaboličnim procesima organizma.*

*Slobodan Glišić*

## Bibliografija

### Monografije i poglavlja u monografijama: M14

- 1) G. Nikolić, M. Cakić, S. Glišić, D. Cvetković, Ž. Mitić, D. Marković, Study of green nanoparticles and biocomplexes based on exopolysaccharide by modern Fourier transform spectroscopy, (in press) Chapter in book: "Fourier transforms", Prof. Goran Nikolic (Ed.), ISBN: 978-953-51-4927-9, Publisher: InTech, November 2016, Available from: <http://www.intechopen.com>.

### Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja: M23

- 1) S. Glišić, G. Nikolić, M. Cakić and N. Trutić, Spectroscopic study of copper(II) complexes with carboxymethyl dextran and dextran sulphate, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 89 (7), (2015), 1254-1262.
- 2) S. Glišić, M. Cakić, G. Nikolić, B. Danilović, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of carboxymethyl dextrane stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1084 (2015), 345–351.
- 3) M. Cakić, S. Glišić, G. Nikolić, G. M. Nikolić, K. Cakić and M. Cvetinov, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1110, (2016), 156–161.

### Časopis nacionalnog značaja: M52

- 1) S. Glišić, M. Cakić, N. Cekić, G. Nikolić, Razvoj i ispitivanje antiseptičnih bioaktivnih kozmetičkih formulacija prirodnog porekla, *Savremene tehnologije*, 2(1) (2013), 05-14.

### Radovi na domaćim naučnim skupovima: M64

- 1) S. Glišić, M. Cakić, G. Nikolić, Fizičko-hemijska analiza kompleksa karboksimetil dekstrana sa različitim biometalima, *X Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj"*, Leskovac, Zbornik izvoda radova (2013), OHT-36, str.134.



- 2) **S. Glišić, M. Cakić, G. Nikolić**, Synthesis and characterization of carboxymethyl dextrane stabilized silver nanoparticles in aqueous medium, *XXIII Congress of chemists and technologists of Macedonia*, Ohrid, Book of abstracts (2014), MST-003, p. 195.
- 3) **S. Glišić, M. Cakić, G. Nikolić**, Spectroscopic study of complexation of various bivalent metal ions with carboxymethyl dextrane, *XXIII Congress of chemists and technologists of Macedonia*, Ohrid, Book of abstracts (2014), SSC-001, p. 257.
- 4) **S. Glišić, M. Cakić, G. Nikolić, G. Nikolić**, Synthesis and characterization of nanoparticles of silver with dextran sulfate, 11<sup>th</sup> Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Book of abstracts (2015), OHT-14/OCT-14, p.108.
- 5) **S. Glišić, M. Cakić, G. Nikolić, B. Todorović, K. Cakić, Ž. Mitić, N. Radosavljević-Stevanović**, Synthesis and characterization of nanoparticles of silver stabilized by carboxymethyl dextran, 11<sup>th</sup> Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Leskovac, Book of abstracts (2015), OHT-15/OCT-15, p.109.
- 6) **S. Glišić, Lj. Stanojević, D. Cvetković, J. Zvezdanović, G. Nikolić, M. Cakić**, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced from *Fumaria officinalis* L. Herba extract, *XXIV Congress of chemists and technologists of Macedonia*, Ohrid, Book of abstracts (2016), MPCE-011, p.215

#### Tehnička rešenja: M83

- 1) **Slobodan Glišić, Milorad Cakić, Goran Nikolić**, Zeleni postupak sinteze nanočestica srebra stabilizovanih karboksimetil dekstranom, Ev. br. 04-421/1, 16.03.2016. Tehnološki fakultet, Leskovac. Usvojeno na NNV 29.03.2016.
- 2) **Milorad Cakić, Slobodan Glišić, Goran S. Nikolić, Žarko Mitić, Dragana Marković-Nikolić**, Idejno rešenje postupka dobijanja hematopoetski bioaktivnog kompleksa kobalta stabilizovanog karboksimetil dekstranom, Ev. br. 04-2311/1, 18.12.2017. Tehnološki fakultet, Leskovac. Usvojeno na NNV 25.12.2017.



---

Прилог 1

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

### **РАЗВОЈ БИОКОМПЛЕКСА И НАНОЧЕСТИЦА БИОАКТИВНИХ МЕТАЛА СТАБИЛИЗОВАНИХ ОЛИГОСАХАРИДИМА**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни 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, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Лесковцу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације:

**Слободан Глишић**

Потпис докторанда:  


---



---

Прилог 2

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: **Слободан Глишић**

Студијски програм: **Технолошко инжењерство**

Наслов рада: **РАЗВОЈ БИОКОМПЛЕКСА И НАНОЧЕСТИЦА БИОАКТИВНИХ МЕТАЛА  
СТАБИЛИЗОВАНИХ ОЛИГОСАХАРИДИМА**

Ментор: **проф. др Милорад Цакић**

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Лесковцу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације:

**Слободан Глишић**

Потпис докторанда:



Прилог 3

### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

#### РАЗВОЈ БИОКОМПЛЕКСА И НАНОЧЕСТИЦА БИОАКТИВНИХ МЕТАЛА СТАБИЛИЗОВАНИХ ОЛИГОСАХАРИДИМА

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
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 подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Лесковцу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације:

**Слободан Глишић**

Потпис докторанда:

## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).