

Polielektrolitni višesloj kitozan/poli(akrilna kiselina): priprava, karakterizacija i antibakterijska svojstva

Babić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:786751>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Luka Babić

**Polielektrolitni višesloj
kitozan/poli(akrilna kiselina):
priprava, karakterizacija i antibakterijska
svojstva**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2023. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Davora Kovačevića i neposrednim voditeljstvom Tina Klačića, mag. chem. i dr. sc. Jasmine Jukić.

Diplomski rad izrađen je u okviru istraživačkog bilateralnog slovensko-hrvatskog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Modulacija polifenolnog profila voća uslijed fizikalnih tretmana nakon branja (IPS-2020-01-6126).

Zahvale

Prije svega, zahvaljujem se mom dragom mentoru, prof. dr. sc. Davoru Kovačeviću čiji me znanstveni rad i istraživački duh privukao da postanem dio vrlo drage istraživačke skupine. Njegovo mentorstvo bilo je nezamjenjivo u izradi ovog rada, jako sam zahvalan što je pristao biti moj mentor, motivirao me i svojim otvorenim i vedrim pristupom potaknuo da naučim i istražim što više mogu. Hvala Vam što ste bili moj mentor i voditelj naše skupine, uistinu ste kohezivna sila koja svojim iskustvom, znanjem i karizmom drži ovu radnu skupinu na okupu i fizikalni zavod čini boljim mjestom za učenje i rast istraživačkog duha.

Svom neposrednom voditelju Tinu Klačiću, mag. chem. htio bih zahvaliti na svakoj pomoći koju je pružio od višeg praktikuma fizikalne kemije pa sve do obrane diplomskog rada. Tvoj doprinos ovom radu je nemjerljiv. Cijenim što sam uz tebe svaki puta nešto novo naučio, što si vrlo često ostao puno dulje od radnog vremena samnom na faksu kako bi prikupili eksperimentalne podatke. Što si uvijek bio dostupan, ažuran i aktivan kad mi je nešto trebalo. Hvala ti što si me usmjerio u znanosti i pokazao mi nebrojene mogućnosti koje ona pruža. Zahvaljujem se dr.sc. Jasmini Jukić koja je sa mnom uz prof. dr. sc. Kovačevića i Tina Klačića, mag. chem. postavila temelje ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se fizikalnom zavodu kemijskog odsjeka. Priznajem, kad sam upisao fizikalnu granu kemije na diplomskom studiju osjećao sam strah do kostiju. Strahopoštovanje prema toj grani kemije osjećam i dalje, ali s vremenom sam naučio kako da me ono motivira za napredak. Zahvaljujem se svim profesorima s fizikalno-kemijskog zavoda koji su s velikim žarom i predanošću prenijeli svoja znanja mojim kolegama i meni. Naučili ste me da su moji strahovi neutemeljeni. Uvelike ste doprinijeli da fizikalna kemija postane moja strast, a ne izvor straha i nesigurnosti. Hvala dragim kolegama sa zavoda što vam je kolegijalnost bila vrlina a ne obaveza.

Zahvaljujem se radnoj skupini iz Ljubljane na edukaciji i pruženju uvjeta za mjerenja koja su bila ključna za ovaj diplomski rad. Hvala prof. dr. sc. Klemen Bohinc, prof. dr. sc. Anamarija Zore i dr. sc. Roman Štukelj što ste odvojili vremena i pomogli mi s mnogim mjerenjima, vještinama i pružili mi toplu atmosferu izvan domovine.

Zahvaljujem se KSET-u i stotinama divnih ljudi koje sam upoznao volontirajući zadnjih 8 godina. KSET-u se zahvaljujem što me odgojio nakon odlaska iz rodnog grada i omogućio mi da se kreativno izrazim, rastem i upoznam ljude koje danas mogu zvati najboljim prijateljima. Zahvaljujem se Zavodu za eksperimentalni zvuk na razumijevanju i podršci; ljudima otvorenog uma i najboljim prijateljima s kojima i dalje djelujem kroz spomenuti glazbeno-koncertni program. Zahvaljujem se radio studentu na strpljenju i predivnim ljudima koje sam imao prilike upoznati kroz rad na radiju. Hvala Bilišu, Dori, Resmanu, Adrijani, Nini, Manjkasu, Marjanu, Svenu... godinama već slušate o mom faksu iako vas možda uopće i ne zanima, drago mi je da imam tako veliki broj bliskih prijatelja i da kročimo kroz život zajedno. Hvala Sari što je zadnjih pola godine bila uz mene unatoč mojoj odsutnosti zbog obaveza. Sara legenda si, zahvalan sam ti što si uz mene.

Mojoj dragoj obitelji ipak se najviše zahvaljujem. Znam da nije samnom lako, ali nekako vi to uspijevate bez da mi to (prečesto) dajete do znanja. Hvala mama što si izdržala sve ove godine uz mene, hvala ti što si uvijek tu za mene kad mi treba razgovor i što si mi omogućila da unatoč svemu odrastem, obrazujem se i podržala me da ostvarim mnoge želje i ambicije koje sam imao uz fakultet. Hvala Petra na konstantnoj pomoći, na emocionalnoj i psihičkoj potpori, na tvojoj sigurnosti i stabilnosti koju si mi uvijek uspijevala prenijeti. Hvala Tomica na pomoći, podršci, strpljenju i na ležernom pristupu koji mi je vrlo često pomogao kad god bi se stvari činile pretjerano kompliciranima. Jako sam zahvalan što imam obitelj koja me voli i podupire, što se međusobno podupire i koja raste i razvija se uz mnogo ljubavi i povjerenja. Za kraj, hvala mojem pokojnom ocu. Hvala ti što sam imao oca. Hvala ti što si mi usadio sustav vrijednosti i svjetonazore u koje unatoč odrastanju i vremenskom odmaku i dalje vjerujem. Hvala ti za obitelj i sve sretne trenutke.

Luka Babić

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. Polielektroliti	6
2.1.1. <i>Kitozan i poli(akrilna kiselina)</i>	<i>8</i>
2.2. Polielektrolitni višeslojevi.....	10
2.3. Antimikrobna svojstva polielektrolitnih višeslojeva	12
2.4. Lizozim.....	16
2.5. Nabijanje površina i elektrokinetički potencijal	19
2.6. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti.....	23
2.7. Potencijal strujanja.....	24
2.8. Elipsometrija	27
2.9. Profilometrija	28
2.10. Mikroskopija atomskih sila	31
2.11. Tenziometrija	32
2.12. Pretražna elektronska mikroskopija.....	35
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	38
3.1. Materijali	38
3.2. Metode.....	40
3.2.1. <i>Mjerenje pH i kalibracija elektrode</i>	<i>40</i>
3.2.2. <i>Priprema supstrata: suspenzija nanočestica SiO₂ i ravne pločice SiO₂</i>	<i>40</i>
3.2.3. <i>Priprema otopina</i>	<i>41</i>
3.2.4. <i>Priprema polielektrolitnih višeslojeva na SiO₂ nanočesticama</i>	<i>41</i>
3.2.5. <i>Priprema polielektrolitnih višeslojeva na pločicama SiO₂</i>	<i>42</i>
3.2.6. <i>Adhezija bakterija</i>	<i>42</i>
3.2.7. <i>Tenziometrija</i>	<i>45</i>
3.2.8. <i>Elipsometrija.....</i>	<i>46</i>
3.2.9. <i>Elektroforetsko raspršenje svjetlosti</i>	<i>46</i>
3.2.10. <i>Mikroskop atomskih sila.....</i>	<i>47</i>
3.2.11. <i>Pretražni elektronski mikroskop.....</i>	<i>48</i>
3.2.12. <i>Mjerenja potencijala strujanja polielektrolitnih višeslojeva na ravnoj površini SiO₂</i>	<i>49</i>

3.2.13. Profilometrija	50
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	52
4.1. Karakterizacija površinskog naboja	52
4.1.1. Određivanje izoelektrične točke nanočestica SiO_2	52
4.1.2. Pokretljivost SiO_2 nanočestica prekrivenih polielektrolitnim višeslojevima.....	53
4.1.3. Mjerenje potencijala strujanja SiO_2 pločica prekrivenih polielektrolitima	55
4.2. Debljina polielektrolitnih višeslojeva	57
4.2.1. Određivanje debljine oksidnog sloja.....	57
4.2.2. Određivanje debljine polielektrolitnog višesloja	58
4.3. Indeksi loma polielektrolitnih višeslojeva	62
4.4. Hrapavost površine	63
4.4.1. Određivanje hrapavosti površine mikroskopom atomskih sila	63
4.4.2. Profilometrija.....	65
4.5. Kontaktni kut	66
4.6. Adhezija bakterija.....	68
4.7. Utjecaj površinskih svojstava na adheziju bakterija	69
§ 5. ZAKLJUČAK	73
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	75
§ 7. LITERATURA.....	76
§ 8. DODATAK.....	XIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

POLIELEKTROLITNI VIŠESLOJ KITOZAN/POLI(AKRILNA KISELINA): PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA

Luka Babić

Polielektroliti su makromolekule koje se sastoje od ponavljajućih podjedinica koje se mogu ionizirati u vodenoj otopini. Uzastopnom naizmjeničnom adsorpcijom polielektrolita različitih naboja na supstrat, pomoću „sloj po sloj“ metode, nastaje polielektrolitni višesloj. Polielektrolitni višeslojevi se mogu koristiti kao antibakterijski filmovi. Na adheziju bakterija utječu hrapavost, naboj i hidrofilnost površine. U ovom radu istražena su svojstva polielektrolitnog višesloja koji se sastoji od kitozana i poli(akrilne kiseline), te višeslojeva na koje je adsorbiran lizozim. Rezultati mjerenja zeta potencijala i potencijala strujanja pokazali su da je površina istraženih filmova negativno nabijena pri fiziološkom pH. Utvrđeno je da je površina pripremljenih višeslojeva hidrofilna i približno jednake hrapavosti koja odgovara glatkim površinama. Adhezija bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* istražena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa te je ustanovljeno da su antibakterijska svojstva filmova izraženija kada je lizozim zadnji sloj.

(95 stranica, 70 slika, 4 tablice, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: antiadheziv, baktericid, lizozim, polielektroliti, polielektrolitni višesloj

Mentor: prof. dr. sc. Davor Kovačević

Neposredni voditelj: Tin Klačić, mag. chem. i dr. sc. Jasmina Jukić.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević

2. prof. dr. sc. Željka Soldin

3. doc. dr. sc. Marko Močibob

Zamjena: prof. dr. sc. Tajana Begović

Datum diplomskog ispita:

23. 2. 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

POLYELECTROLYTE MULTILAYER CHITOSAN/POLY(ACRYLIC ACID): PREPARATION, CHARACTERIZATION AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES

Luka Babić

Polyelectrolytes are macromolecules comprised of repeating units that could be ionized in an aqueous solution. Polyelectrolyte multilayers are prepared by alternating adsorption on a substrate using „layer by layer“ method. Polyelectrolyte multilayers can be used as antibacterial films. Bacterial adhesion depends on properties such as roughness, charge and hydrophilicity. In this thesis, these properties of a polyelectrolyte multilayer consisting of chitosan and poly(acrylic acid), as well as those with an added layer of lysozyme were studied. Zeta and streaming potential results showed that the examined surfaces were negatively charged at physiological pH. The surfaces of all prepared multilayers were hydrophilic and had similar roughness which corresponds to smooth surfaces. Adhesion of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was studied using scanning electron microscopy and it was shown that antibacterial properties were more pronounced in the case with lysozyme as the terminating layer.

(95 pages, 70 figures, 4 tables, 57 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: Antiadhesive properties, bactericide, lysozyme, polyelectrolyte, polyelectrolyte multilayer

Mentor: Dr. Davor Kovačević, Professor

Assistant mentor: Tin Klačić, mag. chem. and dr. sc. Jasmina Jukić

Reviewers:

1. Dr. Davor Kovačević, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Tajana Begović, Professor

Date of exam: February 23, 2023.

§ 1. UVOD

Tijekom svog rada, Alexander Fleming je u bakterijske kulture dodavao sve što mu je došlo pod ruku kako bi otkrio tvari koje usporavaju njihov rast ili ih ubijaju. Jednog dana, bio je prehladen te je u kulturu dodao kap mukusa. Na njegovo veliko iznenađenje ta kap usporila je rast bakterija, čime je ustanovio kako ljudi imaju vlastitu prirodnu zaštitu protiv infekcija. Bio je to prvi znanstveno-empirijski susret znanosti s lizozimom i njegovim djelovanjem.¹ Lizozim je velika proteinska molekula, te kao takva teško može poslužiti kao lijek, ali na sreću u daljnjem istraživanju Fleming je otkrio i prave antibiotike (penicilin) koji i dan danas služe u borbi protiv bakterijskih infekcija.²

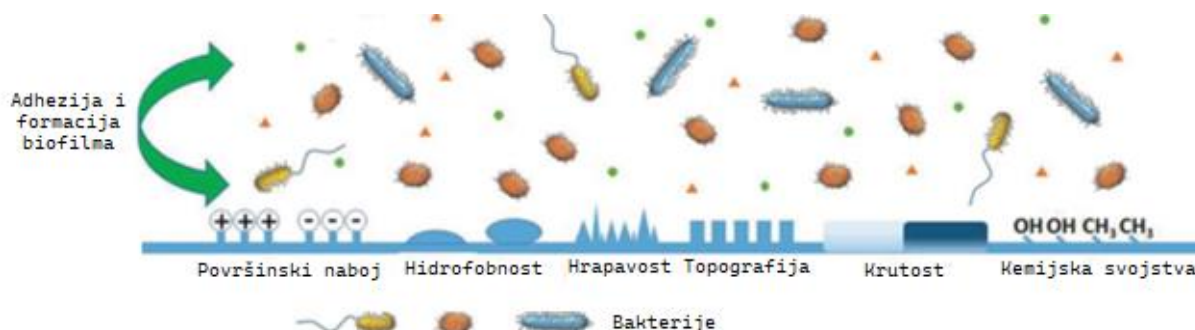
Antibiotici su vrlo moćan alat koji pomaže ljudima u borbi s nadmoćnim carstvom bakterija, ali od samog trenutka kad ih je Fleming čudesno otkrio njihova efektivnost krenula je padati. Pad efektivnosti posljedica je dakako nevjerojatne moći bakterija da se adaptiraju na uvjete u okolišu te tvore potomke koji će također nadići prepreke koje im je njihova okolina nametnula. Ranije spomenuti antibiotici su jedna od takvih prepreka, a bakterijska rezistencija na njih posljedica ogromne sposobnosti adaptacije. U prirodi, bakterije bi u kontakt s antibioticima dolazile rijetko, a najčešće baš onako kako su i otkriveni – u kompetitivnom okruženju različitih vrsta bakterija, ali i bakterija i drugih organizama kao što su gljivice. Ljudi su od otkrića antibiotika povećavali frekventnost kontakta bakterija s antibioticima što je uzrokovalo rezistenciju na antibiotike kod velikog broja što patogenih što nepatogenih bakterija. Kako su antibiotici i dalje najmoćnije ljudsko oružje protiv bakterijskih infekcija, bakterijska rezistencija na njih predstavlja jedan od najvećih budućih ali i sadašnjih izazova čovječanstva. Naravno, odgovorno terapijsko korištenje antibiotika najmanje je zaslužno za povećanje broja bakterija koje su rezistentne na antibiotike. Korištenje antibiotika u krive svrhe, ograničen pristup svježoj vodi i sanitarijama, nemar oko prevencije i higijene u zdravstvenim ustanovama i mesnoj industriji su ono što je dovelo čovječanstvo do točke u kojoj mora odlučiti o budućnosti svoje borbe protiv nadmoćnog, ali golim okom nevidljivog neprijatelja.³ Novi i poboljšani antibiotici samo su dio budućeg rješenja jer broj rezistentnih patogenih bakterija bez iznenađenja puno brže raste od broja pronađenih sigurnih i učinkovitih antibiotika. Prevencija mora u budućnosti predstavljati glavninu borbe protiv bakterijskih infekcija kako bi čovječanstvo došlo do održivosti u potrošnji antibiotika, gdje će oni zaista služiti samo kao

zadnja linija obrane od ugroze infekcijom. Činjenica da se bakterije nalaze na svakoj površini, svakom kutku i svakoj pukotini na Zemlji potakla je Louisa Pasteura na poznati citat - „Gospodo, mikrobi će imati zadnju riječ“, a danas ta rečenica zbog spomenute rastuće rezistencije na antibiotike dobiva na sve većoj važnosti.

Ljudi najčešće dolaze u kontakt s bakterijama putem površina koje su one kolonizirale, te je stoga jedan od ključnih koraka u prevenciji infekcije taj da se te površine učini nepogodnima za bakterijsku kolonizaciju. U zdravstvenim ustanovama, gdje se najčešće i javljaju bakterije rezistentne na antibiotike to je od posebne važnosti. Tamo se površine redovito čiste i tretiraju antibakterijskim sredstvima i steriliziraju kako ne bi došlo do daljnje transmisije bolesti. Infekcije se događaju i tijekom operativnih zahvata iako su instrumenti sterilni, a medicinsko osoblje se pridržava higijenskih standarda. Ponekad se u ljudski organizam unose strana tijela kao što su umjetni kukovi, zubni implantati, ortopedski vijci i sl.. Takvi predmeti moraju biti sterilni jer će se u suprotnom javiti bakterijska infekcija koja je opasna po život pacijenta. Zadnjih tridesetak godina u biomedicinskim istraživanjima došlo je do značajnih iskoraka po pitanju površinskih modifikacija i kontrole površinskih svojstava kako bi se stvorile površine koje pružaju nepogodne uvjete za kolonizaciju i rast bakterija te koje su istovremeno biokompatibilne i ostvaruju povoljne interakcije s tkivima pacijenata.⁴

Osim što bakterije mogu biti patogene za ljude i time predstavljaju prijetnju, bakterije također sudjeluju u dekompoziciji i truležu biljne materije. Trulež odnosno dekompozicija jedan je od elementarnih procesa kojim se osigurava kruženje ugljika, dušika i ostalih elemenata u prirodi, ali on predstavlja i ograničenje u roku trajanja svježeg voća i povrća. Trulež se dešava u nekoliko koraka, a započinje na površini. Prvi korak je gubitak vode i fragmentacija biljnih stanica što omogućava veću površinu bakterijama za kolonizaciju. Kad bi se površina voća i povrća mogla modificirati da se ta dva procesa uspore – rok trajanja bi im se značajno produljio. Za početak, potrebno je razmisliti o trenutnim svojstvima površina voća i povrća, a zatim o karakteristikama površina kakve priželjkujemo nakon modifikacija. Uzmimo za primjer jabuku. Površina jabuke, odnosno njena kora sastoji se od pektinskih ugljikohidrata koji su negativno nabijeni pri neutralnom pH, a karboksilne funkcionalne skupine čine ju hidrofilnom. Iako naizgled glatka, njena kora hrapava je na mikrometarskoj skali. Postavlja se pitanje, kako ta svojstva utječu na trulež jabuke? Površina ukoliko je negativno nabijena trebala bi elektrostatski odbijati bakteriju (slika 1) čija je stijenka negativno nabijena jer se u njenom sastavu nalazi *N*-acetilmuraminska kiselina koja je također negativno nabijena zbog disocijacije protona.⁵

Hrapava površina generalno će pogodovati bakterijskoj adheziji i kolonizaciji jabuke (slika 1). Kao što je poznato iz literature, hidrofilnost površine smanjivat će mogućnost adhezije (slika 1) osim ako se ne radi o superhidrofobnoj površini.⁶



Slika 1. Shematski prikaz bakterijske adhezije i utjecaja svojstava materijala na bakterijsku adheziju (površinski naboj, hidrofobnost, hrapavost, topografija i krutost). Slika preuzeta i prilagođena iz (7).

Nakon što smo nabrojali ovih nekoliko karakteristika površine dolazimo do problema. Određena svojstva površine pogoduju adheziji, a određena ne. Već na ovakve jednostavne postavke vidljivo je kako se radi o kompleksnoj međuigri raznih faktora i parametara. Površinu želimo modificirati na način da se ne isušuje te da ju bakterije ne koloniziraju, a osim toga, ako ponekoj bakteriji i uspije adhezija, ne želimo da poživi i da se razmnoži. U ovakvom slučaju bi oko kore bio poželjan kompaktni film koji neće propuštati vlagu. Takav film bi bilo dobro da se sastoji od biokompatibilnih spojeva koji su razgradivi odnosno jestivi. On bi trebao biti gladak. Poželjno nabijen jer pozitivan naboj ne podržava život bakterije, a negativan ima efekt elektrostatske repulzije. Hidrofilan, jer prisutnost vode onemogućava usidrenje bakterije, čime smanjuje njenu sposobnost adhezije i stvaranja biofilma. Bilo bi idealno kad bi imao baktericidno djelovanje, ali ne bi bilo loše da ima i fungicidno. Izgled jabuke ne bi se zbog njega trebao promijeniti, dakle film bi trebao biti proziran i tanak.

Površinske modifikacije u biomedicini, prilikom ugradnje stranih tijela kao što su implantati, ortopedski vijci i umjetni kukovi rade se već desetljećima. Cilj takvih modifikacija je naravno da se izbjegne bakterijska infekcija. Kako bi se ranije opisani film priredio, nužno je zaviriti u područje biomedicine i iskoristiti postignuti napredak u sintezi površinskih materijala i karakterizaciji površinskih svojstava. Područje koje trenutno ponajviše obećava u pogledu željenih površinskih modifikacija su polielektrolitni višeslojevi, PEM-ovi (engl. *Polyelectrolyte multilayer*, PEM). PEM-ovi se najčešće dobivaju slaganjem polikationa i polianiona jednog na drugi, a interakcije su najčešće elektrostatskog tipa, iako najpoznatiji proces slaganja PEM-ova, tzv. sloj po sloj, LbL proces (engl. *Layer by Layer*, LbL)⁸ u svoje okrilje uzima i druge tipove

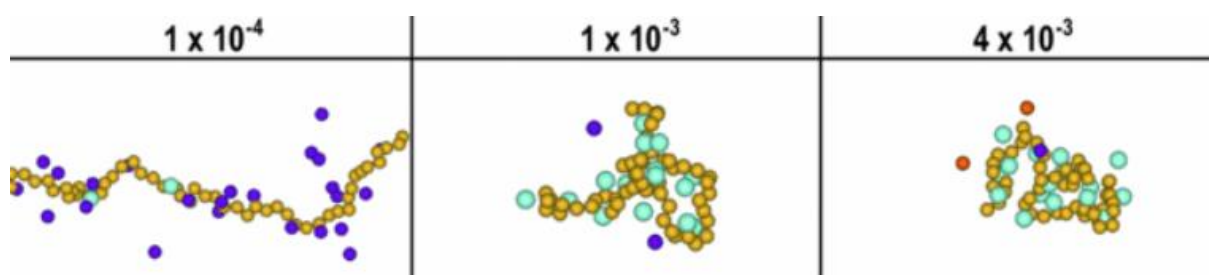
interakcija kao što su vodikove veze, pa čak i kovalentno vezanje između molekula. PEM-ovi se na taj način mogu pripremiti umakanjem supstrata u otopine polielektrolita, a različita fizikalno-kemijska i mehanička svojstva mogu se dobiti ovisno o uvjetima izgradnje (pH, ionska jakost) i korištenim polielektrolitima. Interakcija između polielektrolita može biti slaba ili jaka, a posljedica toga je različita brzina rasta debljine filma. PEM-ovi mogu rasti linearno i eksponencijalno, a način na koji rastu može diktirati njihovu primjenu kasnije. Linearno rastući filmovi su kompaktni filmovi čija debljina ostaje u nanometarskom rasponu, dok eksponencijalni već nakon desetak slojeva može biti u mikrometarskom.⁹ Način rasta je bitan jer se i njihova primjena tako mijenja. Filmovi čija debljina eksponencijalno raste najčešće su mekani i hidratizirani, a mogu se koristiti kao rezervoari za proteine ili manje molekule, najčešće lijekove. Najistraživaniji sustav koji se koristi kao rezervoar je hijaluronska kiselina/poli(L-lizin) (HA/PLL).¹⁰ Kako bi zaštitili jabuku, mi želimo napraviti film koji kontaktno ubija bakteriju, a ne da služi kao rezervoar koji će otpuštati antibiotik – na taj način samo bi pospješili nastanak sve više vrsta rezistentnih bakterija, a ljudi bi tijekom konzumacije isto unosili dodatne količine antibiotika u organizam. Ovaj problem već je zapravo riješio Alexander Fleming čije je otkriće ranije spomenuto u ovom radu. Lizozim se ne može koristiti kao lijek jer je prevelik da bi putovao između stanica i tako oslobodio tijelo od infekcija, ali zato se može primijeniti topikalno. Njegova primarna struktura, tj. aminokiselinski sastav je takav da je on pozitivno nabijen pri svakom fiziološkom pH, što nam govori da ga je moguće adsorbirati na neku negativno nabijenu površinu gdje će biti fiksiran. Uz lizozimov pozitivni naboj, najbitniji antibakterijski efekt je taj da katalizira lizu bakterijske stijenke. Vidimo sada da se površina jabuke može modificirati na zbilja mnoge načine kako bi se njen rok trajanja produžio. Jedan od načina je da se priredi PEM na njenoj površini sa željenim svojstvima. U ovom diplomskom radu istražena su svojstva PEM filmova koji su priređeni od dva polielektrolita – kitozana (engl. *chitosan*, CS) i poli(akrilne kiseline) (engl. *poly(acrylic acid)*, PAA). Na PEM-ove priređene od spomenutih polielektrolita adsorbiran je lizozim koji dodatno poboljšava antibakterijska svojstva površine. U radu su pripremljene 4 vrste filmova: (CS-PAA)₄-CS, (CS-PAA)₅, (CS-PAA)₄-CS-Lys, (CS-PAA)₅-Lys, a njihova svojstva ispitana su pomoću velikog broja metoda i instrumenata. Debljina PEM-ova ispitana je pomoću mikroskopije atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) i elipsometrije, hrapavost pomoću AFM-a i profilometrije, površinski naboj pomoću potencijala strujanja i mikroelektroforetskih mjerenja, optička svojstva uz pomoć elipsometrije, hidrofilnost

mjerenjem kontaktnih kuteva polegnute kapi, a bakterijska adhezija praćena je uz pomoć pretražnog elektronskog mikroskopa (engl. *Scanning electron microscope*, SEM).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Polielektroliti

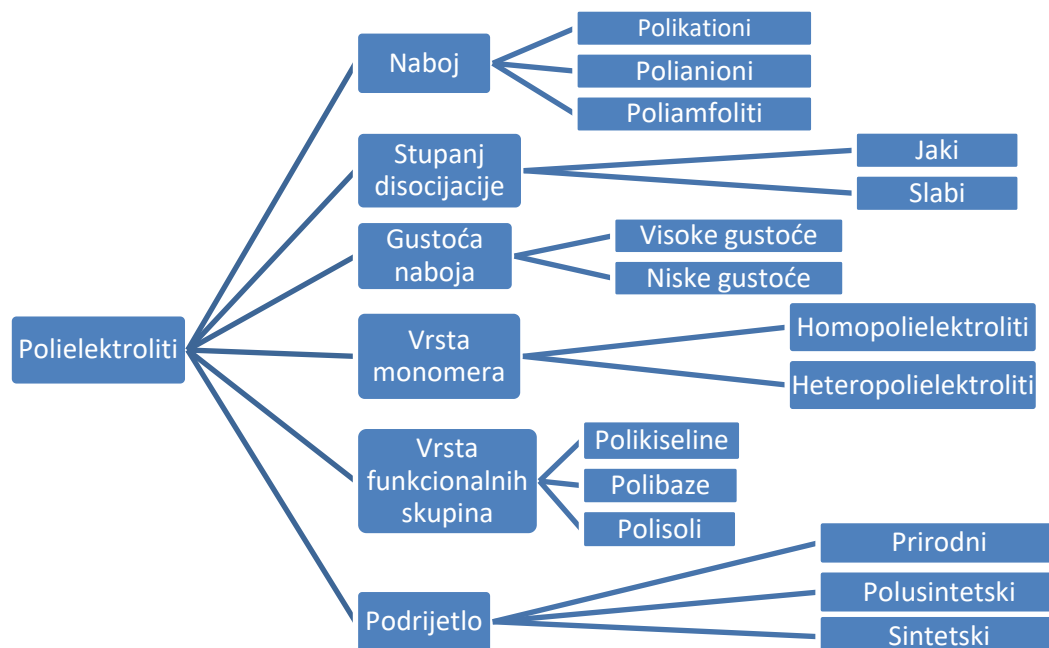
Polielektroliti su makromolekule koje sadrže mnogo ionizabilnih skupina što ih čini visoko nabijenim elektrolitima. Polielektroliti sadrže funkcijske skupine koje mogu disocirati ili se na njih mogu vezati vodikovi ioni. Zbog toga polielektroliti se mogu klasificirati u polianione, polikatione i poliamfolite prema naboju koji ionizirani oblik polimera nosi. Zbog navedenih svojstava oni su topljivi u polarnim otapalima, a kad se otope u polarnom otapalu kao što je voda sadrže veliki broj nabijenih skupina. Generalno mogu imati razne takve skupine, a oni koji sadrže jednu vrstu nabijenih nazivaju se homogenim polielektrolitima ili homopolielektrolitima. S druge strane postoje i heteropolielektroliti koji se sastoje od dva ili više monomera. Polielektroliti mogu biti biološkog podrijetla (npr. DNA, proteini), polusintetski (npr. derivati celuloze) ili mogu biti sintetski (npr. poli(natrijev stirensulfonat), NaPSS). Polielektrolite od nenabijenih polimera razlikuje njihova topljivost u vodi, mogućnost bubrenja, hidrofilnost i njihova mogućnost stvaranja snažnih elektrostatskih interakcija sa suprotno nabijenim površinama ili makromolekulama.¹¹ Ova svojstva polielektrolita usko su povezana sa snažnim elektrostatskim interakcijama u polielektrolitnim otopinama te su stoga osjetljiva na pH, količinu i tip polielektrolita prisutnih u otopini. Prema jakosti dijele se na dva tipa polielektrolita, a to su jaki i slabi. Jaki polielektrolit je onaj koji potpuno disocira u otopini u velikom području pH-vrijednosti. S druge strane, slabi polielektrolit disocira uz konstantu disocijacije (pK_a) u rasponu od ~ 2 do ~ 10 , što znači da će biti samo djelomično nabijen u otopini, a naboj je moguće kontrolirati mijenjanjem pH otopine i ionske jakosti.¹² Promjenom pH-vrijednosti otopine utječemo na gustoću naboja polielektrolita čime možemo dobiti polielektrolite visoke ili niske gustoće naboja. Promjenom ionske jakosti otopine možemo utjecati na konformaciju polielektrolita. S porastom udjela nekog protuiona javlja se smanjenje broja odbojnih interakcija između jedinica što konformaciju gura u smjeru nastanka tzv. konformacije klupka. Niža ionska jakost s druge strane uzrokuje suprotan efekt gdje se konformacija izdužuje, zbog čega ju nazivamo izduženom konformacijom (slika 2).^{13, 14}



Slika 2. Utjecaj ionske jakosti na konformaciju polielektrolita. Preuzeto i prilagođeno iz (15)

Zbog velike količine naboja koji nose, za njih su karakteristične reakcije sa suprotno nabijenim polielektrolitima i površinama. Najčešće nabijene površine na koje se oni adsorbiraju su oksidi metala, polumetala, ali i na biološke uzorke kao što su celulozne površine.¹⁶

Kombinacija polimernih i elektrolitnih svojstava čini ih vrlo dobrim za mnoge potencijalne primjene u industriji i biomedicini. Neki primjeri takvih primjena su flokulacijski agensi, disperzanti u keramičkim prahovima te plastifikatori u mješavinama betona. Mnogi šamponi, sapuni i kozmetički preparati sadrže polielektrolite, određeni polielektroliti dodaju se u hranu, primjerice kao premazi ili agensi koji pospješuju otpuštanje tvari. Neki od primjera polielektrolitnih aditiva u hrani su pektin, alginati i karboksimetil celuloza.¹⁷

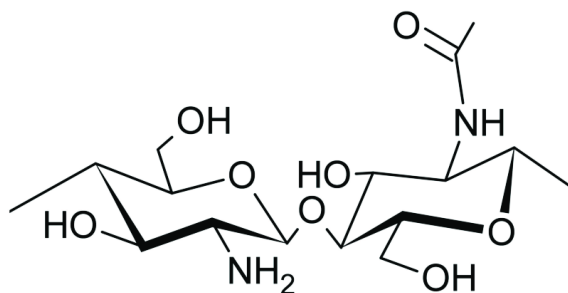


Slika 3. Klasifikacija i vrste polielektrolita

2.1.1. Kitozan i poli(akrilna kiselina)

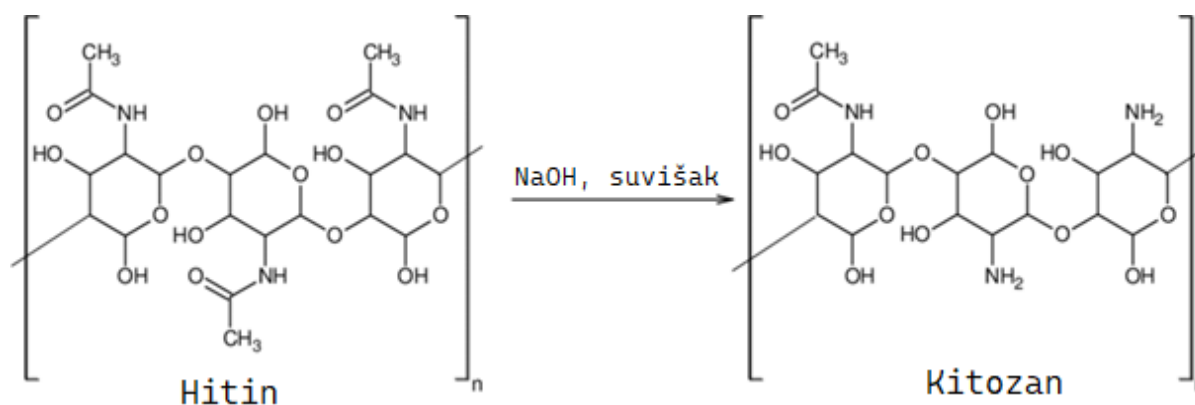
Kako su u ovom diplomskom radu korištena dva specifična polielektrolita, u nastavku slijedi pregled najbitnijih svojstava kitozana i poli(akrilne kiseline). Oba polimera su linearni homopolielektroliti visoke gustoće naboja. PAA je sintetski polielektrolit, dok je kitozan polusintetski polielektrolit. Postoje naznake da je linearna PAA biokompatibilna za razliku od razgranate, a kitozan je biokompatibilan zbog čega je često korišten u medicini i prehrambenoj industriji.^{18,19}

Kitozan (slika 4.) se sastoji od dva monomera - glukozamina i N-acetilglukozamina. Pri niskom pH, amino skupine se protoniraju čime kitozan postaje polikation i topljiv u vodi, a pri $\text{pH} > 6$ naboj na polielektrolitu se smanjuje te on postaje netopljiv. Zbog različitog stupnja N-acetilacije kitozana, njegova topljivost može varirati ovisno o pH od 6,0 do 6,5.



Slika 4. Kemijska struktura kitozana. Slika preuzeta i prilagođena iz (20)

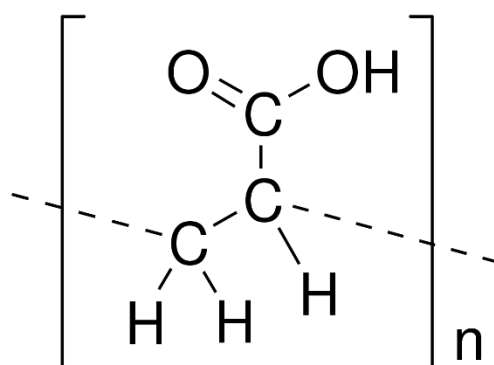
Kitozan se proizvodi komercijalno deacetiliranjem hitina (slika 5.) koji se nalazi u egzoskeletonu člankonožaca i staničnim stijenjkama gljiva.¹⁸



Slika 5. Deacetilacija hitina (lijevo) u kitozan (desno). Preuzeto i prilagođeno iz (21)

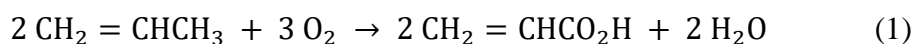
Kitozan je biomolekula topljiva u vodi. U vodi nabija, zbog čega se iz otopine brzo veže na negativno nabijene površine. Ima mnoge komercijalne i biomedicinske primjene. Može se koristiti u agrikulturi kao biopesticid i fungicid, a u biomedicini najčešće se koristi u zavojima kako bi smanjio krvarenje i kao antibakterijski spoj, a također se koristi i za prijenos lijekova kroz kožu.²²

Akrilna kiselina (slika 6.) je najjednostavnija nezasićena karboksilna kiselina koja se sastoji od vinilnih skupina na koje je vezan karboksilni dio. Ona je bezbojna tekućina koja ima karakterističan oštar miris sličan octenoj kiselini. Akrilna kiselina miješa se s vodom, alkoholima, eterima i kloroformom.

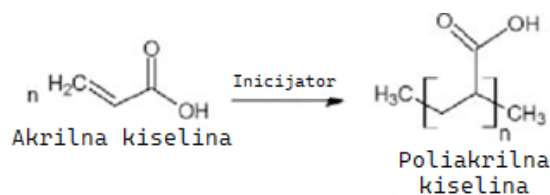


Slika 6. Kemijska struktura poli(akrilne kiseline) (PAA). Preuzeto i prilagođeno iz (23)

Proizvodi se oksidacijom propilena (jednadžba (1)), a poliakrilna kiselina nastaje polimerizacijom monomera akrilne kiseline.



Poliakrilna kiselina nastaje mehanizmom slobodnih radikala u otopini korištenjem natrijevog peroksodisulfata i natrijevog disulfata kao inicijatora polimerizacije (slika 7). Poliakrilna kiselina je slabi polianion čiji stupanj ionizacije ovisi o pH otopine. U neioniziranom obliku nalazi se pri niskim pH-vrijednostima. PAA se može vezati za mnoge neionske polimere (npr. polietilen oksid, poli-n-vinil piroolidon i poliakrilamid) s kojima tvori interpolimerne komplekse pomoću vodikovih veza. U vodenim otopinama može raditi komplekse sa suprotno nabijenim polimerima kao što je kitozan.

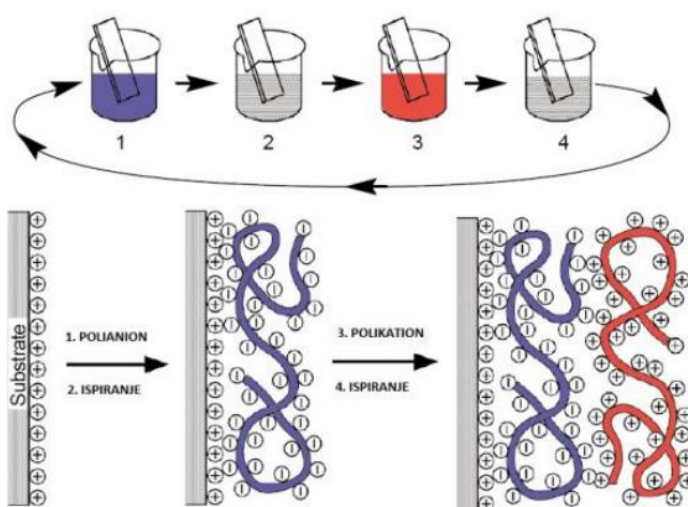


Slika 7. Shematski prikaz polimerizacije akrilne kiseline u poli(akrilnu kiselinu). Preuzeto i prilagođeno iz (24)

Poliakrilna kiselina koristi se kao surfaktant, zbog biokompatibilnosti se koristi u biomedicini kao film na ortopedskim implantatima. Koristi se kao stabilizator u bojama i kozmetici, a novije primjene uključuju hidrogelove PAA koji se mogu koristiti kao zavoji za rane i pomoćne tvari za zacjeljivanje rana.¹⁶

2.2. Polielektrolitni višeslojevi

Polielektrolitni višeslojevi (engl. *polyelectrolyte multilayers*, PEMs) su filmovi koji se pripremaju na površini supstrata metodom alternirajućeg uranjanja supstrata u polianionsku i polikationsku otopinu. Ovakav način izgradnje zove se sloj po sloj (engl. *layer by layer*, LbL) metoda i jednostavan je i praktičan način za pripremu nanofilmova ovakvog tipa. Na primjer, u ovakvom načinu pripreme početno negativno nabijeni supstrat uranja se u otopinu polikationa nakon čega nastaje pozitivno nabijeni gornji sloj polikationa na supstratu. Sustav se zatim ispire nakon čega se uranja u otopinu polianiona i ispire. Ovaj postupak se ponavlja do željenog broja slojeva u višesloju (slika 8).⁸



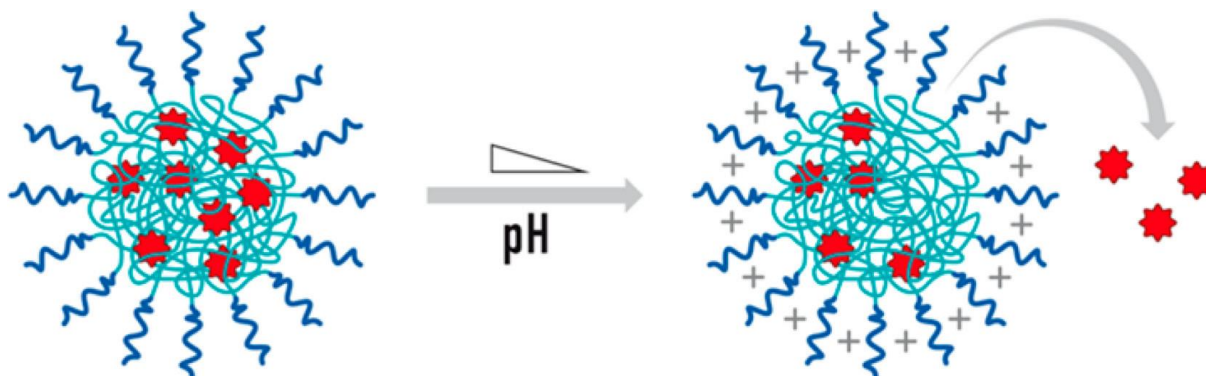
Slika 8. Shematski prikaz pripreve PEM-ova. Preuzeto i prilagođeno iz (8)

Nastajanje polielektrolitnog višeslojeva se temelji na elektrostatskim interakcijama te je na taj način moguće pripremiti filmove koji se sastoje od stotine slojeva alternirajućih polianiona i polikationa. LbL pristup pripremi polielektrolitnih filmova omogućuje preciznu kontrolu fizikalnih svojstava filma kao što su njegova debljina i morfologija.

Slaganje pomoću LbL metode dozvoljava nanometarsku preciznost s multifunkcionalnim mogućnostima filma polielektrolitnog višesloja. Kontinuirani rast PEM-ova na bilo kojoj površini oslanja se na dostupnost mnogih veznih mjesta između polielektrolita i ciljane

površine. Rezultat je vezanje sastavnih specija čije su interakcije između kationskog i anionskog para funkcijskih skupina snažne. Polielektrolitna adsorpcija zbog entropijski povoljnog otpuštanja iona i molekula vode uvijek rezultira u prekomjernom naboju terminalnog sloja što će posljedično privlačiti nabijene polielektrolite u idućem koraku i pogodovati rastu višesloja. Rast filma je moguć tako dugo dok postoji suvišak naboja na površini. Svojstva takvih filmova se mogu ugađati mijenjajući vanjske uvjete kao što su pH i ionska jakost. Rast PEM-filmova može biti linearan ili eksponencijalan. Za linearno rastuće filmove debljina se povećava linearno s koracima depozicije, a za eksponencijalno rastuće – debljina se povećava eksponencijalno, barem tijekom prvih koraka depozicije. Dok debljina prvih filmova ostaje u nanometarskoj skali, eksponencijalno rastući filmovi mogu doseći mikrometre nakon 10-15 dvosloja. Linearno rastuće filmove pronalazimo kod polielektrolita koji međusobno jako interagiraju. PEM koji nastaje na takav način ima slojevitú strukturu bez okomite difuzije polielektrolita kroz slojeve.⁹

Za razliku od polimernih filmova, PEM filmovi pokazuju veću permeaciju vode i difuzijske karakteristike koje su bitne za primjenu kao što je dostava lijekova. Dodatno, porozna supramolekularna struktura polielektrolitnih filmova dozvoljava umetanje raznih terapijskih molekula, nanočestica, lijekova ili proteina u njihovu strukturu te otpuštanje pri određenim pH uvjetima (slika 9). Zbog mnogih korisnih svojstava, PEM filmovi imaju mnogo potencijalnih primjena kao multifunkcionalni nanofilmovi. Jedna od zanimljivih budućih primjena PEM-ova su PEM-ovi s antibakterijskim/antimikrobnim svojstvima. Mnogi polielektroliti kao što je kitozan imaju inhibitornu aktivnost na mikroorganizme, a kad su složeni u PEM-ove mogu pronaći primjenu i kao antiadhezijski i antibakterijski filmovi.²⁵



Slika 9. Shematski prikaz otpuštanja djelatnih tvari uslijed promjene pH

2.3. Antimikrobna svojstva polielektrolitnih višeslojeva

Bakterijska adhezija kompleksan je proces na koji utječe nekoliko faktora kao što su svojstva bakterija, karakteristike površine i razni utjecaji okoliša. Bakterije će adherirati na razne površine kako bi pravile guste agregacije/biofilme s debljinom koja je od nekoliko mikrometara do pola metra. Bakterije prisutne na raznim površinama odgovorne su za 80 % svih infekcija. Kako bi eliminirali efekte koje bakterije rade u mnogim poljima, postoje veliki naponi da se razviju antibakterijske površine. Antibiotici će ih ubiti odnosno inhibirati njihov rast, no konačno će ih učiniti rezistentnima na njih, stoga je bitno modificirati površine kako bi interakcije mikroorganizama i kontaktnih materijala bile takve da spriječe adheziju i/ili ubiju bakterije.

Na adheziju i baktericidna svojstva utječu karakteristike kontaktnog materijala kao što su: površinska topografija, hrapavost, hidrofobnost i površinski naboj.^{25, 26} PEM-ovi sami pokrivaju široki spektar funkcionalnih mogućnosti. Ranije smo opisali kako se PEM-ovi pripremaju, a prednosti LbL metode očituju se i u tome da se mogu primijeniti na bilo koji tip supstrata bez obzira na oblik ili sastav. Daljnja prednost je mogućnost kontrole različitih kemijskih, fizikalnokemijskih i mehaničkih svojstava filmova. Na izgradnju antibakterijskih PEM-ova i njihova svojstva utječu mnogi faktori kao što su vrste polielektrolita, otopinska svojstva - temperatura, pH, ionski sastav i jakost. Bakterije se mogu ubiti raznim baktericidnim komponentama temeljenim na različitim mehanizmima. Teški metali kao što su srebro i bakar koriste se naširoko kao baktericidni agensi još od davnina. Poznato je da metalne specije sudjeluju u lokalnim reakcijama koje ometaju enzimske aktivnosti bakterije, onemogućuju funkcije membrane ili oštećuju DNA. Iako teški metali pokazuju značajne baktericidne efekte, njihova primjena je ograničena zbog toksičnosti na stanice sisavaca.¹⁹ Antibiotici ciljano djeluju samo na bakterije te uzrokuju staničnu smrt inhibirajući sintezu DNA, RNA, stanične stjenke ili proteina. Antibiotici s druge strane imaju problem što tijekom vremena i korištenja bakterije razviju rezistenciju na njih. Osim antibiotika, mnoge kationske molekule i supramolekule također pokazuju baktericidna svojstva jer interagiraju s fosfolipidnim komponentama u membrani što dovodi do distorzije membrane i lize stanice zbog razlike u osmotskim tlakovima unutar stanice i okolini.¹⁹ Kemijski tretmani površine fokusirani su na prevenciju adhezije i ubijanje ili inhibiciju rasta patogena prije nego što oni nastane površinu. Brojne površine komercijalno korištenih objekata već su premazane raznim antimikrobnim

agensima. U medicini, iz očitih razloga vrlo je bitna prevencija patogene kolonizacije implantata, stoga je razvoj antimikrobnih filmova koji su ciljano pripremljeni za zaštitu protiv takvih infekcija postao izuzetno bitno područje znanstvenog i tehnološkog istraživanja.

Zbog spomenute važnosti, proći ćemo najbitnije tri strategije za izradu antimikrobnih površina.

1) Prevencija adhezije mikroorganizama

S obzirom na to da je prvi korak u bakterijskoj infekciji preko implantata – bakterijska adhezija, najbolje bi bilo filmove raditi s tim na umu. PEM-ovi otporni na adheziju mogu se dobiti na dva različita načina: 1) korištenjem hidrofilnih PEM-ova koji inhibiraju kontakt bakterije s površinom ili 2) korištenjem filmova određene krutosti.

Za stvaranje površina otpornih na bakterijsku adheziju bitno je koristiti hidrofilne polimere koji mogu inhibirati kontakt ili pristup bakterije površini (slika 10). Nisko ili neadherirajući filmovi bez baktericidnih tvari trenutno su izvrsna antibakterijska opcija koja ne utječe na okoliš. Najjednostavniji način da se izgrade hidrofilni PEM-ovi je da se koriste polielektroliti poznati po svojoj hidrofilnosti. Od polianiona, najpoznatiji takvi polielektroliti su heparin i hijaluronska kiselina, a od polikationa to je kitozan, čija je dodatna prednost što ima antibakterijska svojstva. Zbog činjenice da je kitozan slabi polikation, pH uvjeti su mu ključni kod modulacije antiadhezijskih svojstava. Mijenjanjem pH se može podesiti stupanj njegove ionizacije, pri visokim pH-vrijednostima ima mali stupanj ionizacije zbog čega radi globularne strukture, te su slojevi kitozana deblji. Pri niskim pH-vrijednostima, lanci kitozana stvaraju ravnije strukture te je adsorbirani sloj tanji. Još jedan način da se napravi visoko hidrofilne PEM-ove je da se polielektroliti kemijski modificiraju, a takvi polielektroliti se konačno ugrađuju u višeslojeve ili adsorbiraju na vrh višesloja. Drugi način pripreme antiadhezijskih filmova su visokohidrofobni polielektroliti. Dakle ili potpuno hidrofilne ili potpuno hidrofobne površine sprječavaju bakterijsku adheziju.

Bakterijska stjenka je negativno nabijena stoga će negativno nabijena površina utjecati na to da se elektrostatski odbiju bakterije (slika 10.). Krutost PEM-a sustava utječe na adheziju bakterija. Primjerice PAH/PAA sustavi pri različitim pH-vrijednostima pokazuju drugačija mehanička svojstva, a bakterijska adhezija povećava se s povećanjem krutosti.^{25, 26}

2) Kontaktno baktericidni filmovi

Okružena kapsulom izgrađenom većinom od polisaharida, većina bakterijskih staničnih membrana je negativno nabijena. Stoga su mnogi antimikrobni polielektroliti pozitivno nabijeni kako bi promovirali interakciju s membranom. Pozitivni naboji polikationa inhibiraju rast

bakterija tako da ometaju njihove membrane što ih konačnici i ubije. Kontaktno baktericidni PEM filmovi su razvijeni tako da terminalni sloj bude polikation. Ostali filmovi koji ubijaju na dodir sadrže antimikrobne tvari kao što su nanočestice ugljika ili enzime. Dizajn tih filmova temeljen je na jednostavnosti kontrole površinskog naboja kako bi se inkorporirala bilo kakva vrsta molekule ili čestice u višesloj ili adsorbirala na sam višesloj. Najjednostavniji način da se priredi višesloj s pozitivno nabijenom površinom je tako da se konstrukcija filma završi kad je polikation terminirajući polielektrolit. Prednost korištenja PEM-a nad kationskim monoslojem kako bi se prekrila površina je ta da PEM nije osjetljiv na male promjene u okolini, odnosno da polikation neće disociirati s površine. Jedan takav polikation je već ranije spomenut, a to je kitozan. PEM-ovi s kitozonom inhibiraju bakterijski i gljivični rast. PEM-ovi koji završavaju slojem kitozana imaju antibakterijska svojstva, a to je objašnjeno postojanjem velikog broja amino skupina na površini filma za razliku od onih s polianionskim terminirajućim slojem. Fenolni su spojevi također poznati po tome što uzrokuju smrt bakterijskih stanica zbog dezintegracije stanične membrane. Oni interagiraju s površinom stanice van der Waalsovima interakcijama iz fenilnih prstenova i hidrofobnim lancima lipida. Kvaterni amonijeve soli imaju za prednost to što su permanentno nabijene, neovisno o pH otopine i poznato je da imaju antimikrobna svojstva. Stoga kako bi se poboljšala antibakterijska aktivnost kitozana, sintetizirani su kvaternizirani derivati kitozana i inkorporirani u PEM-ove. Poznato je da će kationski polielektroliti biti baktericidni u otopini, ali i jednom kad se kationske molekule adheriraju na površinu PEM-a, bakterije će umrijeti zbog kontakta s površinom koja je sada pozitivno nabijena. S obzirom na to da su kationske funkcijske skupine stabilne na površini, antibakterijski efekt takvih kontaktno baktericidnih površina traje duže nego onaj temeljen na otpuštanju aktivne tvari (slika 10).

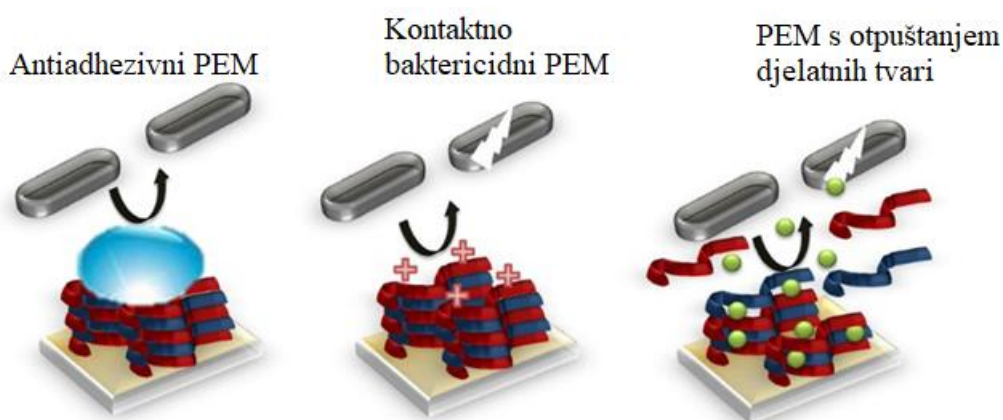
Kitozan i njegovi derivati naširoko se koriste u PEM filmovima baš u svrhu kontaktnog ubijanja bakterija. Kationski protein, lizozim često je korištena tvar za kontaktno ubijanje bakterija, a filmovi na koje je adheriran također pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost.^{25, 26}

3) Filmovi koji otpuštaju djelatne tvari

S obzirom na to da se PEM-ovi mogu izgraditi uz pomoć LbL procesa, otvara se mogućnost inkorporiranja djelatnih tvari između željenih slojeva unutar PEM-a. Nanočestice se mogu ugraditi u PEM tijekom izgradnje. Tako su pripremljeni primjerice antibakterijski filmovi u koje su ugrađene nanocjevčice koje imaju antimikrobnu aktivnost jer prilikom direktnog kontakta s bakterijom uzrokuju značajna oštećenja i punkture na stjenci i membrani bakterije.

PEM-ovi se mogu koristiti za punjenje i imobilizaciju enzima te se na taj način mogu napraviti antibakterijske površine. PEM filmovi koji kontaktno ubijaju imaju konstantnu efikasnost u vremenu, ali njihova je aktivnost ograničena na neposrednu blizinu površine.

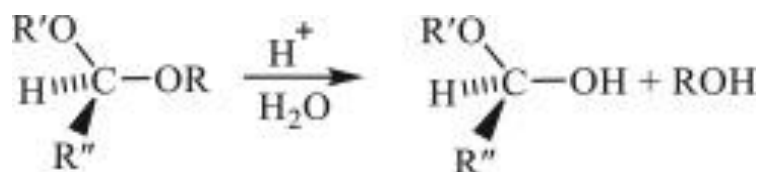
Osim nanočestica u PEM-ove se mogu ugrađivati i antibiotici. Kontrolom uvjeta u okolini takvih sustava možemo kontrolirati i njihovo otpuštanje. Primjerice, ugrađeni kationski antibiotici ubijaju bakterije nakon što se one nastane. Kad se bakterije nastane, one zakisele uvjete što uzrokuje proširenje pora i posljedično tome otpuštanje antibiotika (slika 10). Kako bi se optimizirale dostupne antibakterijske opcije razvijeni su hibridni filmovi koji sadrže i antiadhezijska i antibakterijska svojstva. PEM-ovi mogu i objediniti te dvije funkcije u jedan sustav. Najbitniji aspekt neadhezivnih PEM filmova je njihova antibakterijska efikasnost. Kako bi se ona poboljšala u sustav se dodaje baktericidna funkcija čime se stvara hibridno funkcionalni film. Osim što postoje neadhezivni hibridni PEM-ovi koji također i otpuštaju antibakterijske supstance, postoje i neadhezivni kontaktno baktericidni antibakterijski polielektrolitni višeslojevi.²⁵



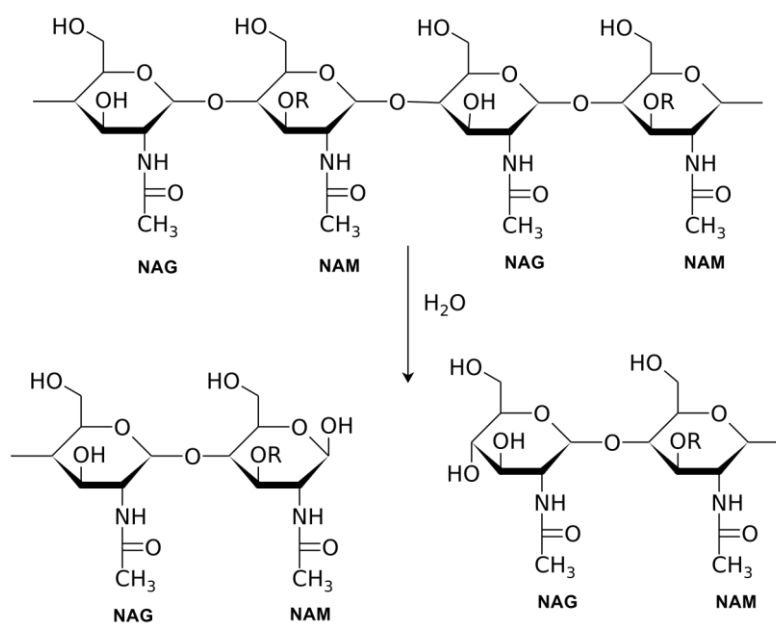
Slika 10. Shematski prikaz tri najbitnije skupine funkcionalnih antibakterijskih PEM-ova; antiadhezivni filmovi, kontaktno-baktericidni PEM-ovi i PEM-ovi koji otpuštaju djelatne antimikrobne tvari. Preuzeto i prilagođeno iz (25).

2.4. Lizozim

Lizozimi su mali stabilni enzim savršeni za istraživanje proteinske strukture i funkcije te su uz to i najčešća skupina proteina koja se može pronaći u PDB-u (engl. *Protein Data Base*). Lizozim je hidrolitička glikozidaza (engl. *β -glycoside hydrolase*, GH). Najbolje istraženi lizozim je onaj izoliran iz bjelanjka kokošnjeg jajeta, a sastoji se od jednog polipeptidnog lanca od 129 amino kiselina. Lizozimi su kationski proteini od otprilike 14 kDa, a osim u bjelanjku jajeta, izozimi lizozima često se nalaze i u sluznicama duž respiratornog trakta.² Bakterije grade snažan zid ugljikohidratnih lanaca koji su međupovezani kratkim peptidnim lancima koji podupiru njihovu delikatnu membranu kako bi izdržale visoki osmotski pritisak koji vlada u stanici. Lizozim cijepa te ugljikohidratne lance te uništava strukturni integritet stanične stjenke zbog čega bakterije pucaju zbog velikog unutarnjeg pritiska. Ovaj protein oštećuje ili ubija bakterije katalizirajući lizu njihove stanične stjenke, a glavna kemija koju omogućuje ovaj enzim može se svesti na kiselinom kataliziranu hidrolizu acetala u poluacetal odnosno reakciju hidrolize β -(1 \rightarrow 4) glikozidne veze između *N*-acetilmuraminske kiseline i *N*-acetilglukozamina (slike 11 i 12).²⁷



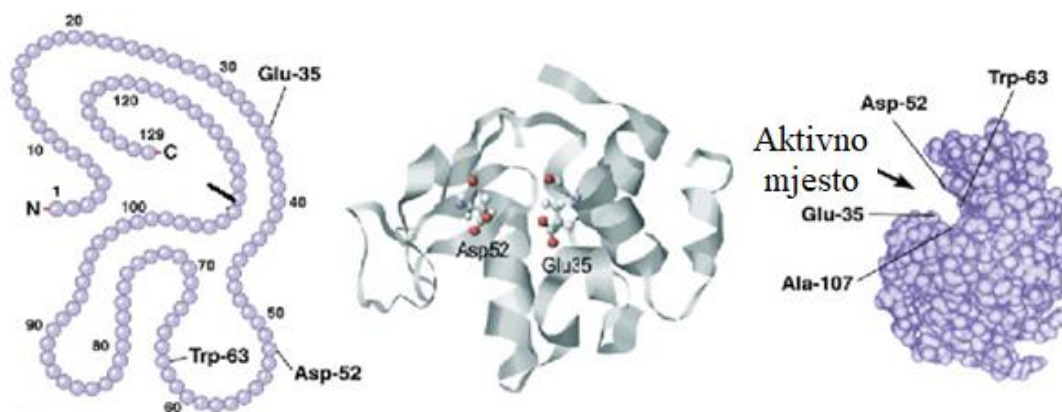
Slika 11. Kiselinom katalizirana hidroliza acetala u poluacetal. Preuzeto i prilagođeno iz (28)



Slika 12. Reakcija hidrolize β -(1 \rightarrow 4) glikozidne veze između *N*-acetilmuraminske kiseline i *N*-acetilglukozamina. Preuzeto i prilagođeno iz (29)

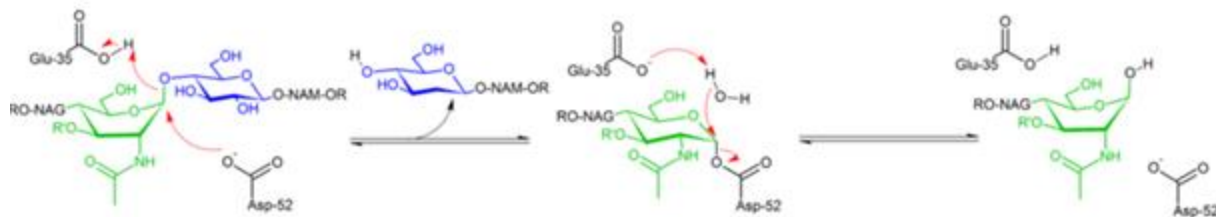
Ovaj supstrat nije prisutan u tkivima sisavaca, ali stanične stijenke bakterija obiluju njime. Lizozim ima dugu pukotinu aktivnog mjesta koja se veže za bakterijski ugljikohidratni lanac, a prema računalnim modelima predloženo je da lizozim iskrivljuje oblik jednog od šećernih prstenova zbog čega glikozidna veza postaje podložna hidrolizi.

Aktivno mjesto veže se na polisaharidni niz od 6 aminošećera (NAM-NAG-NAM-NAG-NAM-NAG). Polisaharidni supstrat pozicionira se pravilno uz pomoć vodikovih veza i hidrofobnih interakcija. Kako bi savršeno odgovarao u pukotinu aktivnog mjesta, supstrat se mora na 4. šećeru izvinuti čime se stvara manje stabilna konformacija. Ovo povećava stres na vezu između 4. i 5. monosaharidne jedinice sve dok se ona ne pokida. Određene aminokiseline u aktivnom mjestu, kao što su ASP-52 i Glu-35 su ključne za katalitičku aktivnost lizozima.



Slika 13. Lizozim iz bjelanjka jajeta: a) primarna struktura, b) terciarna struktura, c) aktivno mjesto s označenim aminokiselinama ključnim za katalitičku aktivnost. Preuzeto i prilagođeno iz (27)

Njihovi bočni lanci interagiraju s 4. i 5. monosaharidnom jedinicom i cijepaju C-O vezu između njih umećući molekulu vode na tu lokaciju (hidroliza). Prvo, bočni lanac Glu-35 donira proton kisiku nestabilne C-O veze čime ga cijepa. Asp-52 stabilizira aktivirani kompleks kroz elektrostatske interakcije i kovalentnim vezanjem na ugljik. Zatim, -OH iz vode napada ugljik da bi se dobio hidrolizirani konačni produkt. Zatim se H^+ iz vode veže na COO^- bočnog ogranka Glu-35 natrag, te lizozim otpušta pokidani lanac i veže se na novi supstrat na bakterijskoj stjenici (slika 14).³⁰



Slika 14. Katalitički mehanizam djelovanja lizozima. Preuzeto i prilagođeno iz (30)

Zbog svoje antibakterijske prirode lizozim često služi kao antimikrobna tvar u hrani. Lizozim se prirodno nalazi u bjelanjku jajeta, a pročišćeni enzim se koristi kao aditiv u hrani, ponajviše u mekanim sirevima. Lizozim je poznati alergen iz bjelanjka, a alergijske reakcije su čak prijavljene nakon konzumacije sireva koji sadrže lizozim kao aditiv. Lizozim se također koristi i za bistrenje vina, ali ljudi na takvo vino ljudi nisu pokazivali alergijske reakcije.³¹

2.5. Nabijanje površina i elektrokinetički potencijal

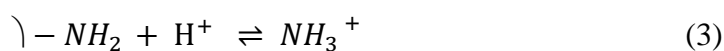
Pojave kao što su elektroforeza i asocijacija iona na površine koloidnih čestica potvrđuju da se one električno nabijaju. Proces koji vode do nabijanja površine i do pojave nehomogene distribucije naboja u prostoru oko površine su bitni jer takva distribucija dovodi do nabijenosti površine.

Postoji nekoliko mehanizama električkog nabijanja koloidnih čestica dispergiranih u suspenziji. Do nabijanja površine može doći uslijed 1) ionizacije odnosno asocijacije/disocijacije iona na površini, 2) adsorpcije iona ili 3) otapanjem i kristalizacijom.

Ionizacija (disocijacija/asocijacija) makromolekule koloidnih dimenzija sadrže nabijene funkcijske skupine kao što su karboksilne, amino skupine i sl. Takve skupine mogu disocirati na ione ili se na njih mogu asociirati ioni. Te skupine su imobilizirane na koloidnoj čestici te zaostaju na njoj, dok ioni ravnotežno asociiraju i disociraju s njih. Ta ravnoteža nam govori o tome je li funkcionalna skupina pozitivno ili negativno nabijena. Dobar primjer čestica koloidnih dimenzija s različitim funkcionalnim skupinama čine proteini. Kod proteina će u kiseljoj otopini, gdje je velik aktivitet H^+ iona, odnosno pH nizak, ravnoteža biti pomaknuta prema nastajanju nedisociranog/elektroneutralnog oblika karboksilne skupine (jednadžba (2)).



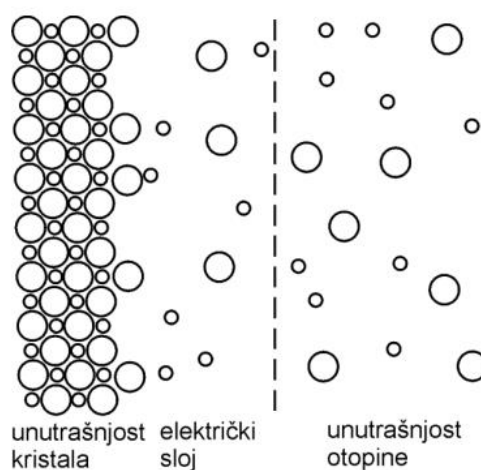
Kod proteina će za amino skupine u kiselom mediju ravnoteža biti pomaknuta u smjeru nastajanja pozitivno nabijenog oblika (jednadžba (3)).³²



U dovoljno kiseljoj otopini prevladavaju dakle pozitivni naboji što možemo ustanoviti mikroelektroforezom; koloidne makromolekule će se kretati prema negativno nabijenoj elektrodi. U bazičnom mediju, bit će manje H^+ iona, stoga će ravnoteža biti pomaknuta prema disocijaciji protona te će u takvoj sredini prevladavati negativni naboj na površini proteina zbog čega će se on kretati u smjeru pozitivno nabijene elektrode. Kako kod proteina, tako i kod drugih makromolekula i koloidnih čestica postoji i slučaj u kojem one miruju u vanjskom električnom polju. To se događa pri pH-vrijednosti koja se označava sa pH_{iep} ili i.e.p., a naziva izoelektričnom točkom (engl. *isoelectric point*, i.e.p.). U izoelektričnoj točki je ukupni naboj i električna pokretljivost jednaka nuli. Osim ionizacije, površinski naboj može mijenjati još i

prisutnost različitih iona koji se nalaze u otopini, ali mehanizam je vrlo sličan, odnosno ukoliko se adsorbira više negativnog naboja – površina će biti negativno nabijena i obratno.³²

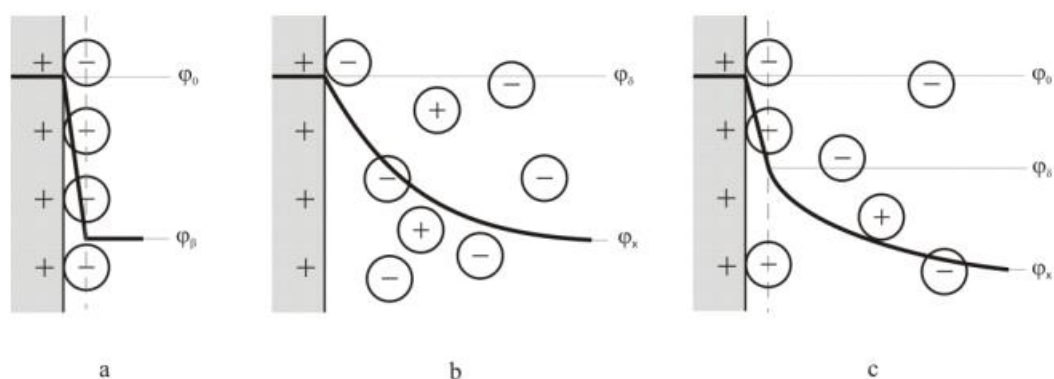
Kod negativno nabijenih površina, uz površinu se nalazi višak aniona u odnosu na katione te će se pripadni kationi pod djelovanjem elektrostatskih privlačnih sila rasporediti u tekućoj fazi u blizini površine. Na adsorbirane ione, protuioni mogu biti adsorbirani ali mogu biti i statistički raspodijeljeni uz samo nabijenu površinu. Protuioni na taj način čine jedan sloj koji se proteže u otopinu sve do točke u kojoj ne dođe do kompenzacije naboja s površine odnosno elektroneutralnosti. Takav međupovršinski sloj naziva se električkim dvoslojem (engl. *electrical double layer*) (slika 15.).



Slika 15. Shematski prikaz električkog dvosloja preuzeto. Preuzeto iz (32)

Električki dvosloj povijesno je ime za model koji se kroz godine mijenjao, a prvi ga je predložio Helmholtz koji je opisao nastanak dvosloja uranjanjem nabijene metalne elektrode u vodenu otopinu. Nabijena metalna elektroda u tom modelu privlačila je ione suprotnog predznaka. Unutarnji dio tako predloženog dvosloja čine nabijena površina ili adsorbirani ioni, a vanjski je sloj protuiona. Karakteristične plohe za Helmholtzov model su površina kovine i β -ploha koja se nalazi na udaljenosti na kojoj se nalaze i centri asociiranih protuiona.²⁷

Nedostatke Helmholtzovog modela su pokušali poboljšati Guoy i Chapman koji su predložili da protuioni ne čine monoionski sloj, već da su raspršeni u difuznom sloju koji je karakteriziran d-plohom potencijala φ_d . Od površine prema glavnini otopine protuioni su raspoređeni tako da je veća koncentracija bliža površini i smanjuje se sve dok ne dođe do unutrašnjosti otopine gdje je raspodjela konstantna (slika 16).



Slika 16. Modeli električnog međupovršinskog sloja na granici faza kovina/elektrolit: (a) Helmholtzov model; (b) Gouy–Chapmanov model; (c) Gouy–Chapman–Sternov model. Preuzeto iz (32)

Dodatno poboljšanje modela uveo je Stern koji je uveo adsorpcijski sloj u model međupovršinskog sloja. Adsorpcijski sloj sadrži protuione koji su asocirani uz površinu, ali svojim nabojem tek djelomično kompenziraju naboj površine. U takvom modelu ioni imaju konačne dimenzije, te postoji najmanja udaljenost iona od površine koja odgovara radijusu iona. Privlačenje iona površini posljedica je djelovanja adsorpcijskih i elektrostatskih sila. Ovakav model naziva se Gouy-Chapman-Sternov model (GCS), a međupovršinski sloj se dijeli na dva dijela – kompaktni u kojem je ovisnost potencijala o udaljenosti linearna i difuzni u kojem potencijal opada nelinearno kako se povećava udaljenost od površine.

Međupovršinski slojevi najčešće se opisuju GCS modelom trosloja ili četverosloja, a razlikuju se po plohama koje definiraju (slika 17). Definirane plohe su:

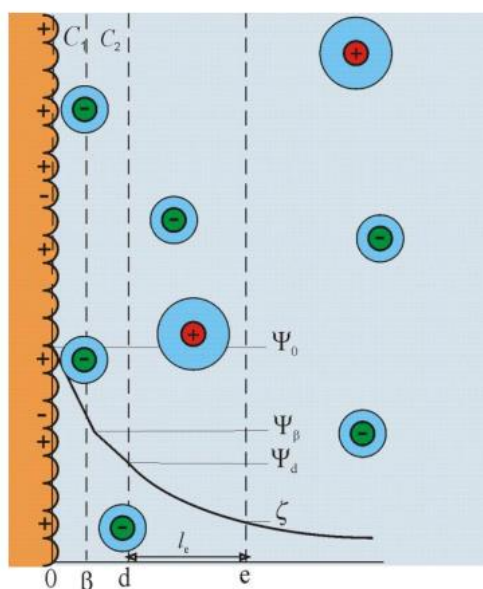
- O -ploha nastala interakcijom površine i adsorbiranih iona koji se nazivaju potencijal odredbeni ioni. Takvoj plohi pripisan je odgovarajući potencijal φ_0 i σ_0 .
- β -ploha koju čine asocirani protuioni s odgovarajućim potencijalom φ_β i gustoćom naboja σ_β .

Zbog uvjeta elektroneutralnosti ukupna gustoća naboja jednaka je nuli

$$\sigma_0 + \sigma_\beta + \sigma_d = 0 \quad (4)$$

Uz navedene plohe kod elektrokinetičkih razmatranja navodi se i s -ploha koja se nalazi na nekoj udaljenosti od početka difuznog sloja, a potencijal koji joj odgovara naziva se elektrokinetičkim potencijalom odnosno zeta-potencijalom (ζ). Ta ploha nalazi se na granici pokretnog i stacionarnog dijela difuznog sloja tijekom gibanja nabijenih čestica, a ζ -potencijal predstavlja

otpor kidanju nabijenih slojeva oko čestice. U električnom polju, kao što je kod mikroelektroforeze, svaka čestica i njezini najbliži asocirani ioni gibaju se kroz otopinu, a ζ -potencijal nalazi se na elektrokinetičkoj plohi između te čestice s asociranim ionima i medija u kojem se nalazi. Kad se sloj makromolekula adsorbira na površinu čestica, elektrokinetička ploha se pomiče od površine što mijenja zeta potencijal. Zeta potencijal je stoga funkcija površinskog naboja čestice, svakog adsorbiranog sloja na površini te prirode i sastava okolnog medija. Može se eksperimentalno odrediti jer odražava efektivni naboj na česticama te ima veze i s elektrostatskim odbijanjem između njih. ζ -potencijal je vrlo relevantan za eksperimentalni pristup izučavanja i kontrolu koloidnih sustava, njihove stabilnosti te procesa flokulacije, adsorpcije i agregacija.³²



Slika 17. Shematski prikaz električnog međupovršinskog sloja prema modelu električnog trosloja.
Preuzeto iz (32)

Elektroforeza, elektroosmoza i potencijal strujanja su tri osnovne elektrokinetičke metode koje se koriste kako bi se odredio zeta potencijal površina koloidnih čestica i makromolekula. Kod elektroforeze i elektroosmoze primjenjuje se električno polje, a promatra se gibanje koloidnih čestica (elektroforeza) ili otopine (elektroosmoza). U mjerenjima potencijala strujanja tekuća faza se pomiče zbog primijenjenog pritiska, a promatraju se nastali potencijal ili struja.

2.6. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti

Za dovoljno velike čestice (iznad 500 nm u promjeru), elektroforetska pokretljivost može se dobiti direktno prateći gibanje čestica pomoću video mikroskopa. Za manje čestice – elektroforetska pokretljivost mjeri se pomoću uređaja za mjerenje elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) (slika 18). U takvom uređaju čestice se gibaju između dvije elektrode pod utjecajem električnog polja te su osvijetljene laserom. Laserska zraka se na koloidnim česticama raspršuje, a zbog njihovog gibanja dolazi do Dopplerovog efekta i pomaka u frekvenciji u odnosu na upadnu zraku. Iz pomaka u frekvenciji i poznate jakosti primijenjenog električnog polja može se odrediti elektroforetska pokretljivost.²⁸ Elektroforetska pokretljivost nabijenih koloida odgovara omjeru njihove brzine, v i intenziteta električnog polja E unutar kojeg se gibaju.

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (5)$$

Elektroforetska mobilnost μ povezana je sa ζ -potencijalom istraživanih čestica na sljedeći način:

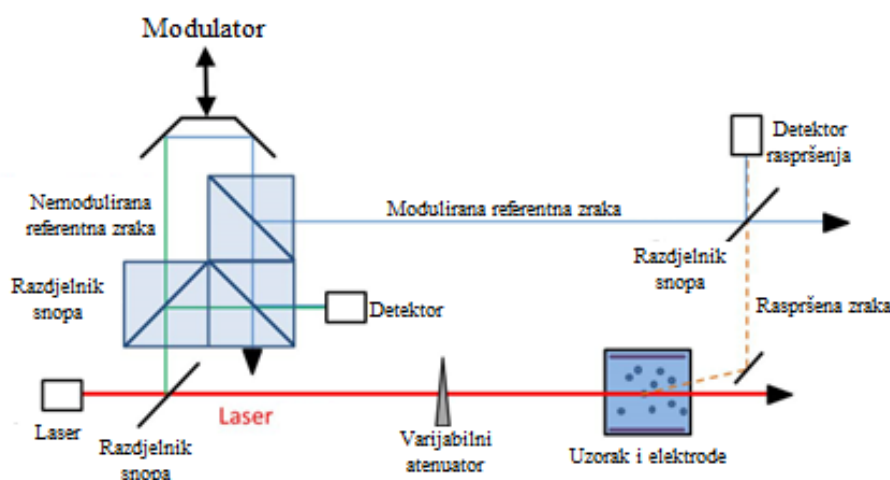
$$\mu = \frac{2\varepsilon\varepsilon_0}{3\eta} \cdot f\left(\frac{a}{L_D}\right) \cdot \zeta \quad (6)$$

gdje je a veličina čestica, a L_D je Debyeova duljina, ε i ε_0 relativna dielektrična konstanta otapala te permitivnost vakuuma. Vrijednost funkcije $f\left(\frac{a}{L_D}\right)$ varira između 1 i 1,5.

Za drugi slučaj – kad se radi o velikim česticama u odnosu na Debyeovu duljinu dobivamo jednadžbu:

$$\mu = \frac{\varepsilon\varepsilon_0}{\eta} \cdot \zeta \quad (7)$$

Ta jednadžba naziva jednadžbom Smoluchowskog.³³



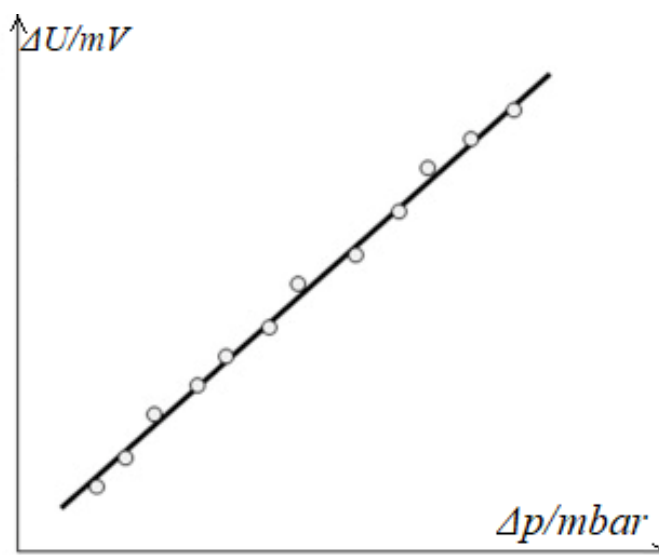
Slika 18. Shematski prikaz konfiguracije instrumenta za elektroforetsko raspršenje svjetlost čestica i određivanje zeta potencijala preuzeto i prilagođeno iz (33)

2.7. Potencijal strujanja

Zeta potencijal membrana i filmova određuje se mjerenjem potencijala strujanja. Potencijal strujanja je električni potencijal koji se stvori kad se otopina elektrolita propušta kroz porozni materijal (transverzalni potencijal strujanja) ili kroz kanal s nabijenim stijenkama (tangencijalni potencijal strujanja). Kod potencijala strujanja, otopina elektrolita teče iz komore definirane geometrije uz pomoć primjene gradijenta pritiska. Ako se površina komore nabije, stvara se električki dvosloj, te dolazi do lokalnog povećanja u koncentraciji protuiona i lokalnog smanjenja u koncentraciji koiona. Električni dvosloj koji se stvori je reda veličine Debyeve duljine koja ovisi o ionskoj jakosti. Primjenom mehaničke sile, dolazi do gibanja naboja u dvosloju što rezultira električnom strujom koja se naziva još i strujom strujanja, a posljedica razlika u potencijalu između dviju referentnih elektroda na početku i na kraju komore zove se potencijal strujanja. Takav potencijal strujanja mijenja se pri različitim tlakovima te se može direktno povezati sa ζ -potencijalom što opisuje sljedeća jednačba:

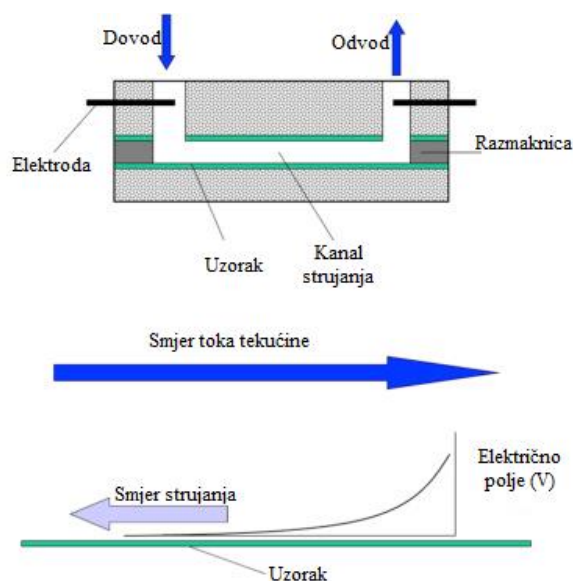
$$\zeta = \frac{\Delta U}{\Delta p} \cdot \frac{\eta \kappa}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (8)$$

U toj jednačbi ΔU označava potencijal strujanja, Δp promjenu u tlaku, a simboli η , κ , ε i ε_0 su redom viskoznost otapala, provodnost otopine i relativna dielektrična konstanta otapala te permitivnost vakuuma. Potencijal strujanja se može izračunati eksperimentalno tako da se odredi linearna ovisnost izmjerenih razlika potencijala o brzini toka odnosno o tlaku kao što je prikazano na slici 19.

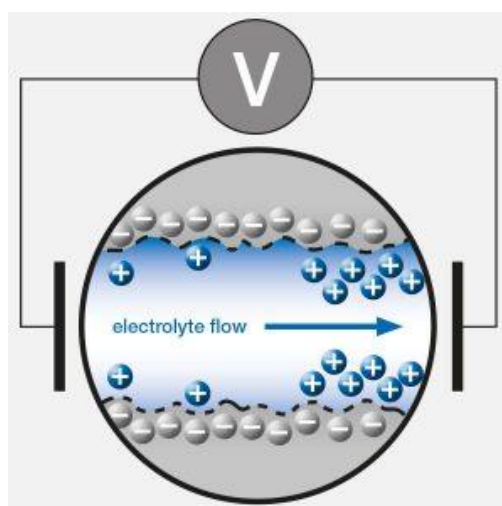


Slika 19. Eksperimentalno određivanje zeta potencijala iz potencijala strujanja. Preuzeto i prilagođeno iz (34)

Tangencijalni potencijal strujanja je metoda koja se koristi kako bi se izmjerio zeta potencijal površine uzorka. Kod takvog mjerenja potencijala strujanja, otopina teče duž aktivne površine uzorka, najčešće kroz kapilaru ili kanal kao što je prikazano na slikama 20 i 21. Otopina elektrolita protječe kroz ćeliju za mjerenje pomoću pumpe. Ćelija ima definirane dimenzije a kanal strujanja je obložen uzorkom koji se nalaze jedan nasuprot drugom i dvije referentne Ag/AgCl elektrode na svakom kraju kanala koje služe kako bi se mjerila razlika potencijala. Koeficijent strujanja predstavlja omjer promjene napona i promjene pritiska u toku ($\Delta U/\Delta p$), a određuje se kao srednja vrijednost od najmanje 10 mjerenja koje bilježi računalo.^{34, 35}

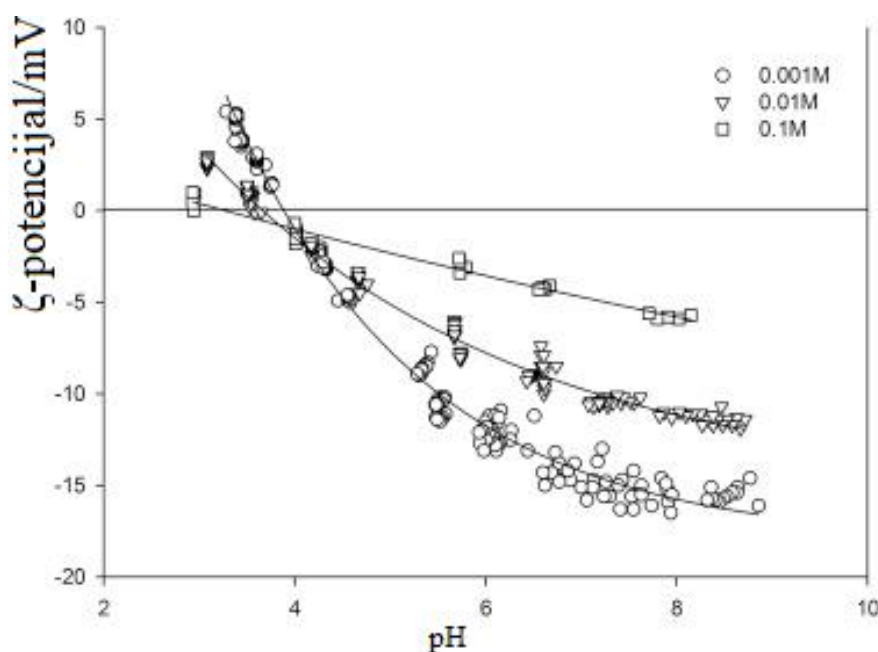


Slika 20. Shema izvedbe instrumenta za mjerenje potencijala strujanja s naznačenim uzorcima i kanalom strujanja (gore). Distribucija naboja uz tok elektrolita (dolje). Preuzeto i prilagođeno iz (34).



Slika 21. Shematski prikaz tehnike potencijala strujanja s ilustriranim tokom elektrolita kroz ćeliju i rezultiranom separacijom naboja. Preuzeto i prilagođeno iz (33).

Također, ζ -potencijal uzorka često se mijenja iz pozitivnog u negativno kako povećavamo pH otopine (slika 22.). Promjene u pH otopini vode do promjene kiselo-bazne ravnotežne kemije na površini. Te promjene utječu na ukupni površinski naboj filma čime se mijenja i broj protuiona u difuznom sloju. Rezultat ove promjene površinskog naboja je i promjena potencijala strujanja. Set mjerenja ζ -potencijala kroz raspon pH daje nam informacije o ravnotežnim procesima adsorpcije i disocijacije na površini uzorka. Ovisnost zeta potencijala o pH i pozicija izoelektrične točke kao funkcije koncentracije elektrolita može se koristiti kako bi se odredio tip funkcionalnih skupina na površini membrana i dokazala adsorpcija specifičnih aniona, kationa, polielektrolita, makromolekula, ali i odredio predznak i vrijednost naboja.³⁴ Ovakva mjerenja daju nam mogućnost promišljanja o daljnjoj adsorpciji molekula na uzorak. Na red veličine potencijala strujanja i zeta potencijal utječe i ionska jakost. Navedene veličine smanjuju se kako se koncentracija soli (ionska jakost) povećava zbog kompresije dvosloja čime se smanjuje i udaljenost između elektrokinetičke plohe i filma. Slika 22 pokazuje kako su zeta potencijali za niske pH-vrijednosti pozitivni, da se *i.e.p.* nalazi između pH = 3 i pH = 4 nakon čega nalazimo negativne potencijale. Također na slici je vidljiv i utjecaj ionske jakosti na ζ -potencijal, pri niskim koncentracijama soli apsolutna vrijednost ζ -potencijala je nešto viša nego pri višim ionskim jakostima.



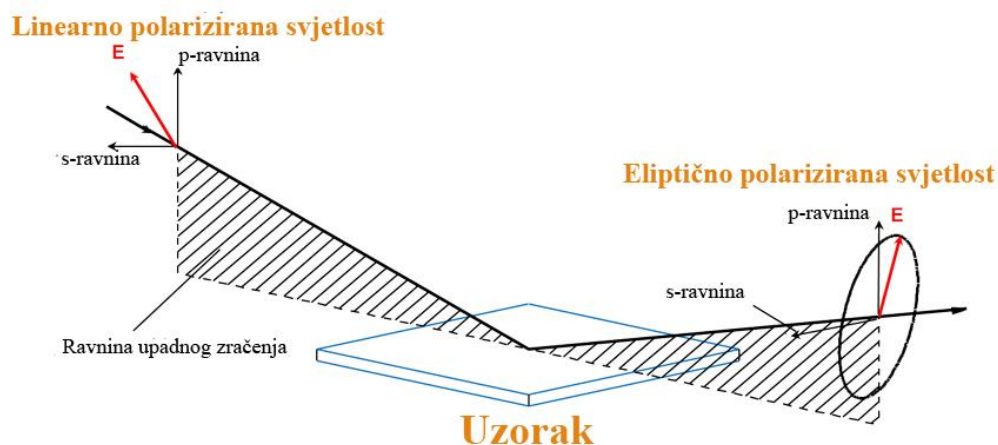
Slika 22. Shematski prikaz tehnike potencijala strujanja s ilustriranim tokom elektrolita kroz ćeliju i rezultiranom separacijom naboja Preuzeto i prilagođeno iz (34)

2.8. Elipsometrija

Elipsometrija je vrlo osjetljiva, nedestruktivna optička tehnika koja koristi polariziranu svjetlost za karakterizaciju tankih slojeva te određivanje njihove debljine i optičkih svojstava. U prošlosti se ta metoda puno češće koristila, no razvojem tehnologije su došle novije tehnike koje daju puno više informacija. Bez obzira na to, elipsometar je i danas poprilično koristan uređaj kojim možemo potvrditi neke rezultate dobivene sofisticiranim metodama.³⁶

Elipsometrija mjeri promjenu polarizacije svjetlosti nakon refleksije (ili transmisije) od površine, odnosno tankog filma. Snimani uzorak može se promatrati kao optički sustav koji modificira polarizaciju upadnog zračenja, iz toga proizlaze daljnji izračuni indeksa loma, debljine uzorka i ostalih veličina.

Princip na kojem radi elipsometar je sljedeći: izvor linearno polarizirane svjetlosti (npr. laser propušten kroz polarizator) reflektira se od površine uzorka pod unaprijed odabranim kutem. Ravnina polarizacije linearno polarizirane svjetlosti uglavnom nije u ravnini upadnog zračenja, iz tog razloga postoje dvije komponente upadne zrake svjetlosti (slika 23.). Jedna komponenta se nalazi u ravnini upadnog zračenja (označava se slovom „p“ u indeksu), a druga komponenta se nalazi u ravnini okomitoj na ravninu upadnog zračenja (označava se slovo „s“ u indeksu). Amplituda i pomak u fazi reflektiranog zračenja su drugačiji od izvornog zračenja, veličina promjene ovisi od uzorka do uzorka koji se snima. Reflektirana svjetlost je eliptično polarizirana od čega proizlazi ime ove tehnike. Promjena u polarizaciji je prikazana kao omjer amplituda, Ψ i razlika u fazi, Δ . Jedna od najčešćih izvedbi elipsometra je ona s rotirajućim analizatorom. Rotirajući analizator za računanje sinusoidalne ovisnosti intenziteta zrake kao funkcije rotacijsko kuta za izračun Ψ i Δ . Zatim se dobivene informacije o polarizaciji preračunavaju u određena svojstva uzoraka poput indeksa loma, debljina filma ili volumnog udjela u višekomponentnom sustavu. Idealni slučaj predstavlja refleksiju laserske zrake na planarnom, beskonačno debelom izotropnom uzorku. U takvom idealiziranom slučaju su sva svojstva i koeficijenti transformacije povezani sa Fresnelovim jednadžbama koje opisuju refleksiju uz transmisiju svjetla nakon prolaska kroz tanki film. Iz koeficijenata dobivenih Fresnelovim jednadžbama određuju se elipsometrijski kut Ψ i razlika u fazi Δ . Variranjem valne duljine izvora, upadnog kuta, debljine sloja i realne i imaginarnu komponente indeksa loma u zadanom modelu na računalnom programu mogu se dobiti debljina (neiterativna metoda) odnosno debljina i indeks loma (iterativna metoda).^{36, 37, 38}

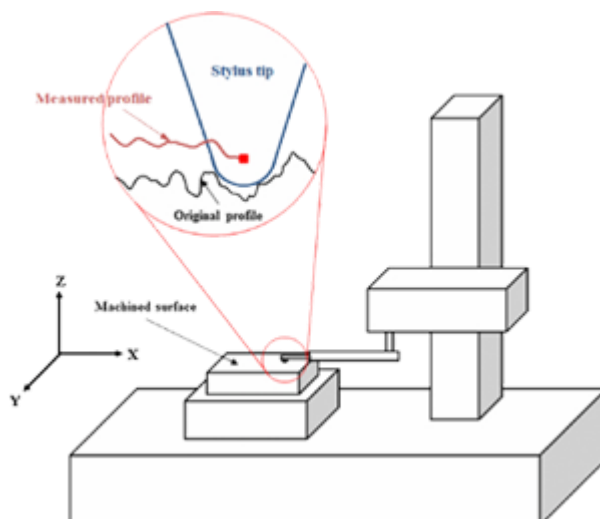


Slika 23. Shematski prikaz refleksije upadnog zračenja i njenih komponenti. Preuzeto i prilagođeno iz (38)

2.9. Profilometrija

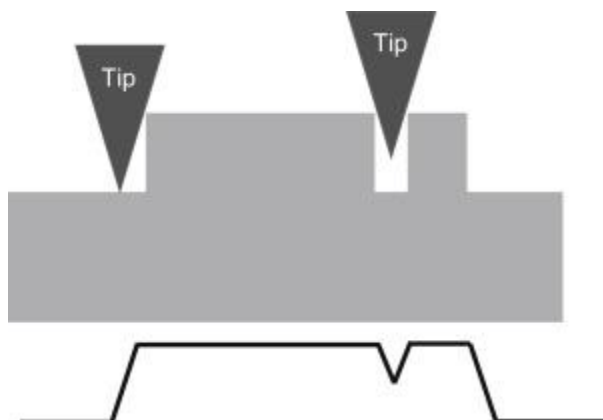
Površinska hrapavost igra bitnu ulogu u antiadhezijskim svojstvima filmova jer utječe na svojstva hidrofилности odnosno hidrofobnosti površine. Iako mnoge površine na oko djeluju glatko, čak i one ispolirane su na mikroskopskim razinama poprilično hrapave. Postoje mnoge tehnike za nanokarakterizaciju, odnosno određivanje površinske topografije uzorka. Među najčešćima koje se koriste su kontaktna i beskontaktna profilometrija, konfokalna mikroskopija, pretražna tunelirajuća mikroskopija (engl. *Scanning tunneling microscopy*, STM) i mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic force microscopy*, AFM).

Profilometrija je tehnika koja se koristi kako bi se dobili topografski podaci vezani uz promatranu površinu. Profilometrijom se može mjeriti jedna točka na površini, jedna linija površine ili se napraviti čitavi 3D sken površine. Svrha profilometrije je da se saznaju morfološke karakteristike površine, visina izbočina i površinska hrapavost. Profilometrijska mjerenja se mogu provesti pomoću probe (kontaktno) ili korištenjem svjetlosti (optički, beskontaktno). Svaki profilometar sastoji se od najmanje dva dijela – detektora i držača uzorka. Detektor određuje što se na uzorku snima, dok ga postolje drži na mjestu. Kod nekih instrumenata se postolje pomiče kako bi omogućilo mjerenje, u nekima se detektor miče, a u nekima su oboje pomični. Postoje dva tipa profilometra, kontaktni (slika 24) i beskontaktni (optički).³⁹



Slika 24. Shematski prikaz kontaktnog profilometra. Preuzeto i prilagođeno iz (39)

Profilometrija zrcali proces prolaska fonografske igle po gramofonskoj ploči. U toj metodi elektromagnetski se prate pomaci mehaničke probe koja dodiruje površinu te prati topografiju uzorka. Kontaktni profilometri (engl. *stylus*) imaju probu kojom detektiraju površinu i fizički pomiču probu po površini kako bi sakupili visine površine. Proba prolazi površinom i prati konture svake točke površine tijekom čega se prati visina probe na svakom položaju što rezultira 1D skenom ili 2D mapom koja se kasnije analizira. To se čini mehanički uz mjerenje sile kojom uzorak pritišće probu tijekom skeniranja površine, a promjene u okomitoj poziciji držača ručice se koriste kako bi se rekonstruirala površina (slika 24). Kontaktna profilometrija zahtjeva silu i fizičko dodirivanje površine, pa iako je ekstremno osjetljiva metoda i donosi visoku razlučivost okomite dimenzije ima i mnoge nedostatke. Nedostaci ovakve metode su da se u ovakvom eksperimentu proba lako može kontaminirati ukoliko se mjere mekane površine, a fizička narav ove metode čini je vrlo često destruktivnom metodom. Vrh probe i njen oblik utječu na razlučivost mjerenja stoga je ova metoda i u lateralnom i okomitom smjeru limitirana na neki način. Proba je veličine nekoliko mikrona u promjeru i to konačno ograničava lateralnu razlučivost ove metode. Zbog te veličine nastaju artefakti jer proba ne može ući u čitavu udolinu između dva vrha što je prikazano na slici 25.⁴⁰ Usprkos tom ograničenju kontaktna profilometrija je i dalje vrlo korisan alat jer joj je okomita rezolucija manja od 1 nm. Profilometrija se često koristi za evaluaciju raznih površina, od kovina i keramika do polimernih filmova.



Slika 25. Primjeri dvije vrste artefakata tijekom mjerenja hrapavosti površine kontaktnim profilometrom. Prikaz nagiba koji nastaje na rubu brijega i ograničenja zbog geometrije šiljka.

Preuzeto i prilagođeno iz (40)

Postoji nekoliko standardnih parametara koji se koriste kako bi se opisala površinska hrapavost, od kojih su najbitniji R_a i R_q .

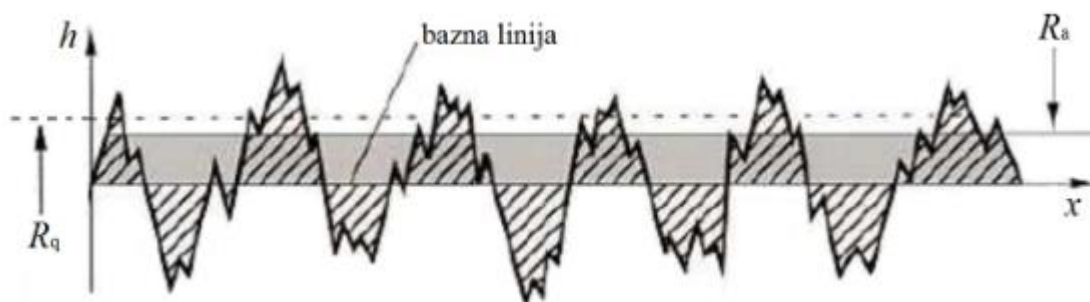
R_a (engl. *average roughness*) je srednje aritmetičko odstupanje mjenenog profila po visini na dužini nekog uzorka.

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |h(x)| dx \quad (9)$$

R_q (engl. *root mean square roughness*) je srednje kvadratno odstupanje mjenenog profila po visini na dužini nekog uzorka.

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L |h^2(x)| dx} \quad (10)$$

gdje $h(x)$ predstavlja funkciju koja opisuje visinski profil površine duž osi x odnosno bazne linije, dok je L željena duljina snimanog područja (slika 26).



Slika 26. Različiti visinski profili površine uzoraka. Prikaz parametara potrebnih za računanje prosječne i RMS hrapavosti. Preuzeto i prilagođeno iz (41)

R_q (RMS vrijednost hrapavosti) se češće koristi jer je puno osjetljiviji na promjene pa će pokazati bolju razlučivost. Kako vidimo, radi se o statističkim parametrima pa se pomoću njih ne može saznati ništa o udaljenost između karakterističnih izbočina i njihov oblik.⁴²

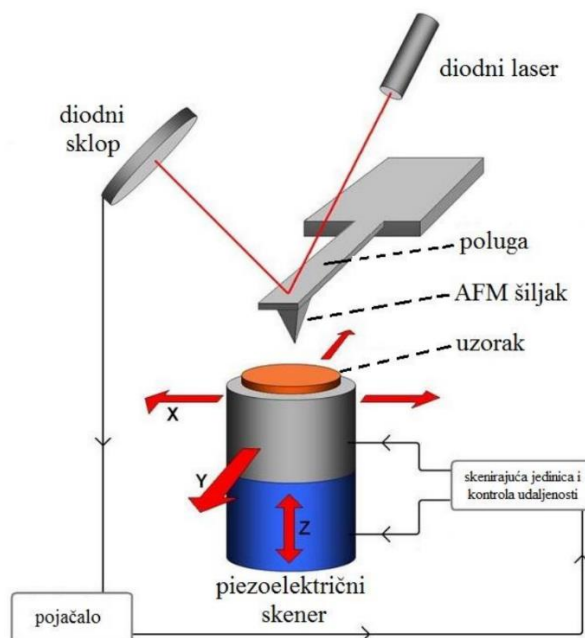
Sila kojom se u profilometriji djeluje ($F \approx 5$ mN) je mnogo veća nego što je to u AFM-u ($F \approx 1$ nN). AFM pokriva mnogo manje površine prilikom snimanja (npr. $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) ali pruža veću razlučivost. Ove činjenice upućuju na to da su AFM i profilometrija komplementarne metode zbog čega je dobro da se obje koriste u karakterizaciji površina uzoraka kako bi se dobile potpune informacije o hrapavosti površina.⁴²

2.10. Mikroskopija atomskih sila

Otkriće pretražnog tunelirajućeg mikroskopa prethodilo je mnogim drugim tehnikama i uređajima, a jedna od njih je mikroskopija atomskih sila. Ova metoda se temelji na mjerenju međumolekulskih sila koje djeluju između atoma uzorka i atoma na vrhu pretražnog šiljka (udaljenost između 0,1 do 10 nm). Pretražni šiljak nalazi se na kraju male poluge koja ima određenu konstatnu opruge. Uređaj može mjeriti inter- i intramolekulske sile, sile adhezije, elastičnost uzorka, tvrdoću te hrapavost površine. Kombinacijom svih podataka dobiva se trodimenzionalna topografska slika površine.^{43,44,45}

Mikroskop atomskih sila (slika 27.) posjeduje optičku komponentu u obliku sustava leća, laserske zrake i detektora. Naime, sila međudjelovanja između vrha šiljka i površine uzorka očitava se kao promjena u refleksiji laserske zrake na poluzi koja pretražuje površinu. Otklon poluge rezultirat će promjenom u refleksiji. Dio uređaja koji pomiče uzorak zove se piezoelektrični skener, primjenom električnog napona na kristal u skeneru ostvaruje se točnost pomaka od nekoliko Å. S obzirom da su sile međudjelovanja vrlo male (od pN do nN) važno je da poluga bude što manje mase i da cijeli uređaj bude izoliran od vanjskih vibracija. Također,

na razlučivost mikroskopa utječe i radijus zakrivljenosti šiljka (tipični radijusi je od 10 do 20 nm), što je šiljak oštiji to će razlučivost biti veća, no time će biti i veći rizik od slamanja šiljka stoga treba biti pažljiv kod primjene željenih sila i postavki snimanja.^{44, 45, 46}



Slika 27. Princip rada mikroskopa atomskih sila. Preuzeto i prilagođeno iz (45).

Postoje dva načina rada mikroskopa atomskih sila, kontaktni i dinamički. Grublji način rada je kontaktni jer je šiljak konstantno u doticaju sa snimanim uzorkom pa kod mekših uzoraka (npr. biološki uzorci) može doći do oštećenja samog uzorka i lošije snimke. Nešto osjetljiviji način rada je dinamički gdje šiljak i poluga pretraživanjem kontinuirano osciliraju gore-dolje. Postoje dva načina tih oscilacija, pipajući i nekontaktni način. Razlika između ta dva načina je što kod pipajućeg šiljak povremeno dolazi u doticaj s površinu uzorka dok kod nekontaktnog načina udaljenost između šiljka i površine je uvijek veća od van der Waalsove udaljenosti.^{44, 46}

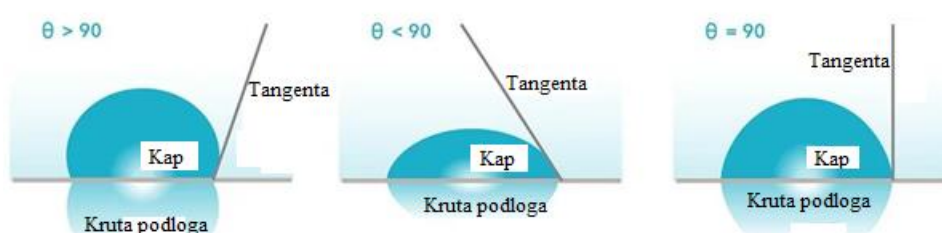
2.11. Tenziometrija

Tenziometrija je metoda kojom se određuje međupovršinska napetost te se ona uobičajeno provodi između tekućine i krute podloge ili plina i druge tekućine. Kontaktni kut (θ) je kvantitativna mjera moćenja krutine od strane kapi neke tekućine. Zaslužna za stvaranje kontaktnog kuta je međupovršinska napetost. Kontaktni kut je geometrijski definiran kao kut koji tekućina stvara na granici tri faze na kojoj se nalaze tekućina, plin i krutina. Youngova jednadžba opisuje balans na dodirnoj točki te tri faze:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos\theta \quad (11)$$

Gdje su γ_{sv} , γ_{lv} , γ_{sl} površinske napetosti krute površine, tekuće površine i površine na granici faza kruto-tekuće.⁴⁷

Najjednostavniji kontaktni kut koji možemo mjeriti je kontaktni kut na položenoj kapi, a naziva se još i statičkim kontaktnim kutom. Statički kontaktni kut nastaje kada kap miruje na površini i ne kreće se (slika 28.), a ovisi o faktorima kao što su kemijska homogenost, topografija i hrapavost površine. Uz statički kontaktni kut, moguće je izmjeriti i dinamičke napredujuće te povlačeće kontaktne kutove. Razlika između napredujućeg i povlačećeg kontaktnog kuta naziva se histerezom kontaktnog kuta.

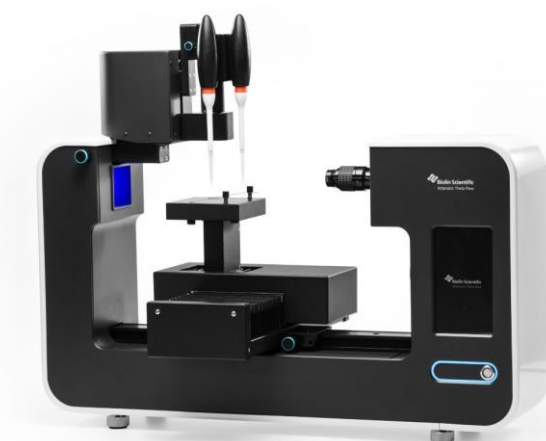


Slika 28. Različiti kontaktni kutevi. Preuzeto i prilagođeno iz (47)

Histereza generalno opisuje neki ireverzibilan proces. Primjerice, kad je kap na višesloju, apsorpcijom tekućine iz te kapi dolazi do bubrenja filma. Kad se kap povlači film se ne vraća u prvotno stanje, već mu je debljina veća od prvotne a uz to su i njegova svojstva hidrofilnosti. Do histereze dolazi zbog kemijske i topografske heterogenosti površine, nečistoća otopine, apsorpcije tekućine u površinu i bubrenja uzorka. Napredujući ili povlačeći kontaktni kutovi predstavljaju maksimalnu i minimalnu vrijednost koju statički kontaktni kutovi mogu imati na površini. Razlika između napredujućih i povlačećih kutova može biti i 50°. Dinamički kontaktni kutovi i histereza kontaktnog kuta relevantni su zbog velikog nedavnog interesa vezanog uz superhidrofobnost i samočišćeće površine jer mali kutevi na kosinama indiciraju da bi površina mogla imati samočišćeću primjenu. Histereza je također bitna za istraživanje ulaska vode u porozne medije, razvoj premaza i adsorpcije. Postoje razne metode da se mjere statični i dinamični kutovi.⁴⁸

Kontaktni kut se mjeri pomoću optičkih tenziometara (slika 29). U najjednostavnijim slučajevima, koriste se manualne hamiltonke kojima se otpušta željeni volumen tekućine na vrhu šprice koji će kasnije završiti na površini. Vrh igle na kojoj se nalazi kap vode nježno se dovede u kontakt s površinom od interesa, a vrh hamiltonke se makne na način da kap zaostane na površini te se ona snima ultra-brzom kamerom. Za ovu prigodu mogu se koristiti i automatske pipete koje željeni volumen automatski istiskuju na površinu. Volumen kapi

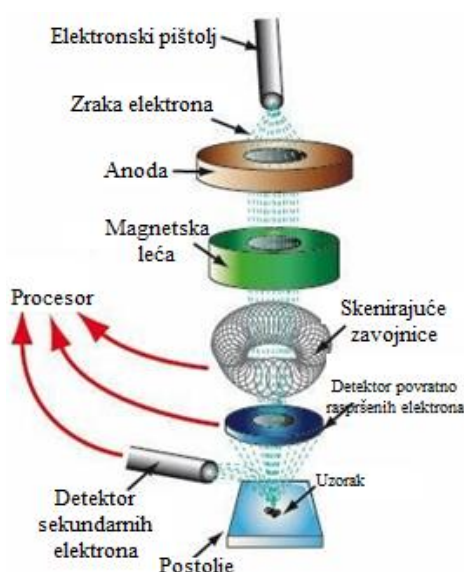
namješta se istiskivanjem ili uvlačenjem tekućine, a mjeri se iz videosnimke u programu pomoću Young-Laplaceove jednadžbe nakon što je uređaj kalibriran uz pomoć kuglice od volframova karbida. Homogenost površine se lako može procijeniti tako da se mjere kontaktni kutevi na različitim mjestima na uzorku. Ponekad metoda može imati probleme jer u nekim slučajevima dolazi do bubrenja uzorka ili apsorpcije što mijenja kontaktni kut zbog čega se eksperiment izvodi u kratkom vremenskom periodu, najčešće do 10 s.



Slika 29. Slika optičkog tenziometra Theta Lite (Attension, Sweden), korištenog u mjerenjima za diplomski rad. Preuzeto iz (49)

2.12. Pretražna elektronska mikroskopija

Pretražni elektronski mikroskop (*engl. Scanning electron microscope, SEM*) (slika 30.) koristi fokusiranu zraku visokoenergetskih elektrona kako bi generirao mnogo različitih signala na površini krutih uzoraka. Signali koje dobivamo dolaze od interakcija između elektrona i površine te one otkrivaju mnoge informacije kao što su morfologija, kemijski sastav, kristalna struktura i orijentacija materijala koji čini naš uzorak. U većini primjena, prikupljaju se podaci nad određenim dijelom površine uzorka, a generirana 2D snimka prikazuje prostorne varijacije u tim svojstvima. Površine koje možemo snimiti variraju između 1 cm i 5 mikrona u širini i mogu se snimiti u pretražnom modu koristeći konvencionalne SEM tehnike s raznim povećanjima i rezolucijama. SEM je također u mogućnosti raditi analizu odabranih točaka na uzorku. Takav pristup je koristan u kvalitativnoj determinaciji kemijske kompozicije, kristalne strukture i kristalnih orijentacija uz korištenje energijski raspršujuće rendgenske spektroskopije (*engl. energy dispersive x-ray spectroscopy, EDS*). Ubrzani elektroni u SEM-u nose značajnu količinu kinetičke energije, a ta energija se raspršuje u obliku mnogih signala koji nastaju tijekom interakcije elektrona i uzorka kada upadni elektroni usporavaju u krutom uzorku. Ti signali uključuju sekundarne elektrone (koji daju SEM slike), povratno raspršene elektrone (*engl. backscattered electrons, BSE*), difraktirane povratno raspršene elektrone (*engl. Electron backscatter diffraction, EBSD*) koji se koriste kako bi se odredila kristalna struktura i orijentacija minerala), fotone (karakteristične x-zrake koje se koriste za elementnu analizu), vidljivu svjetlost i toplinu.⁵⁰



Slika 30. Shema pretražnog elektronskog mikroskopa. Preuzeto i prilagođeno iz (51).

Najbitniji signali za očitavanje morfologije i topografije uzoraka su sekundarni i povratno raspršeni elektroni, a povratno raspršeni elektroni su najbitniji za ilustriranje kontrasta u sastavu kod uzoraka s više faza. X-zrake nastaju od neelastičnih kolizija upadnih elektrona s elektronima u orbitalama atoma uzorka. Kako se pobuđeni elektroni vraćaju u niža energijska stanja relaksacijom daju x-zrake određene valne duljine koje su karakteristične za energijske nivoe svakog elementa. Na taj način iz karakterističnih valnih duljina x-zraka možemo saznati elementni sastav u mineralu. SEM analiza se smatra nedestruktivnom, odnosno svi signali koji nastaju, uključujući x-zrake koje su generirane u takvim interakcijama elektrona i uzorka ne uzrokuju gubitak materije iz samog uzorka stoga je moguće nekoliko puta analizirati iste uzorke.

Komponente svakog SEM-a su:

- Izvor elektrona (tzv. pištolj)
- Elektronske leće
- Postolje za uzorak
- Detektori za sve signale
- Zaslon
- Izvor struje
- Vakuumski sustav
- Sustav za hlađenje
- Antivibracijski stol
- Soba bez magnetskih ili električnih polja

SEM uvijek ima barem jedan detektor - detektor sekundarnih elektrona (engl. *secondary electron detector*, SED), ali većina ih ima i dodatne detektore. SEM se rutinski koristi kako bi generirao visokorezolucijske slike oblika objekata (engl. *scanning electron imaging*, SEI) te kako bi pokazao prostorne varijacije u kemijskom sastavu dobivanjem elementnih mapa ili kemijskih analiza točaka koristeći EDS. SEM-om se mogu precizno snimiti vrlo male karakteristike površine i objekti do cca. 50 nm. Slike povratno raspršenih elektrona (engl. *backscattered electrons*, BSE) koriste se kako bi se dobila brzo razlikovanje faza u uzorcima

više faza. SEM-ovi koji su opremljeni detektorima za povratno raspršene elektrone mogu se koristiti kako bi se istraživala mikrovlakna i kristalografska orijentacija u mnogim materijalima.

SEM je ključan u svim područjima znanosti koja zahtjevaju karakterizaciju krutih materijala. Velika prednost leži u tome da je za tu metodu priprema uzorka neznatna i što je prikupljanje podataka vrlo brzo. Uzorci u kojima isparavaju plinovi pri niskim tlakovima nisu pogodni za uobičajenu visokovakuumsku analizu uzoraka, ali potreba za snimanje i takvih uzoraka dovela je i do pojave SEM-a s niskim vakuumom.^{50, 52}

Priprema uzorka može biti minimalna ili složenija ovisno o vrsti i prirodi uzoraka i podataka koje želimo dobiti. Minimalna priprema uključuje dobivanje uzorka koji će stati u komoru. Većina dielektričnih uzoraka presvlače se tankim slojem provodnog materijala najčešće zlatom ili nekim drugim metalom ili slitinom. Izbor materijala također ovisi o podacima koje treba prikupiti – grafit je najpogodniji za elementnu analizu dok su metalne presvlake najefektivnije za snimanje visoke rezolucije.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Tokom izvedbe ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Octena kiselina, CH_3COOH , ($w \geq 99\%$) (VWR Chemicals)
- Deionizirana voda
- Standardni puferi pH = 3,0; pH = 5,0; pH = 7,0, pH = 9,0 (Gram-Mol)
- Vodikov peroksid, H_2O_2 ($w = 30\%$), p.a. (VWR Chemicals)
- Sumporna kiselina, H_2SO_4 , p.a. (VWR Chemicals)
- Kitozan, $M_w = 190000 - 310000$ g/mol, p.a. (Sigma-Aldrich)
- Lizozim, $M_w = 14,4$ kDa (129AAR) EC 3.2.1.17 (Aldrich, SAD).
- Poli(akrilna kiselina), $M_w = 1800$ g/mol, p.a. (Sigma-Aldrich)
- Otopina fosfatnog pufera (engl. *Phosphate Buffer Solution*, PBS) ($c = 0.1$ mol/L)
- Brain Heart Infusion, BHI (Biolife, Bolzano, Italija)
- Nutrijentni agar
- Natrijev hidroksid, NaOH, p.a. (Sigma-Aldrich)
- Klorovodična kiselina, HCl, p.a. (VWR Chemicals)
- Komprimirani dušik, $\varphi(\text{N}_2) = 99,999\%$ (Messer)
- Komprimirani argon, $\varphi(\text{Ar}) = 99,995\%$ (Messer)

Tokom izvedbe ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći supstrati:

- Silicijska pločica (Siltronic AG)
- Nanočestice SiO_2 , (GetNanoMaterials, St. Cannat, Francuska)

Tokom izvedbe ovog diplomskog rada korišten je sljedeći pribor

- Kombinirana elektroda (Metrohm)
- Hamilton šprica, C205M (Hamilton Company, SAD)
- Različiti analitički pribor (automatske mikropipete, odmjerne tikvice, pipete itd.)
- Razne pincete
- Štrcaljka
- Razne kemijske čaše: 40 mL, 25 mL itd.
- Schott bočice; 40 mL, 100 mL

- Magnetska miješalica, 728 Stirrer (Metrohm)
- Analitička vaga, XS 205 DU/A (Mettler Toledo)
- Petrijeve zdjelice
- Mikrobiološka eza
- Bunsenov plamenik
- Vorteks
- Centrifuga, Centric 250 (Tehtnica)
- Rotacijska miješalica
- Termostat za otopine termostat, F12 (Julabo)
- Termostatska komora, Temperature Chamber – Standard (Kambič, Slovenija)
- UV(C) svijetlo
- Jažice
- Pipete
- Zlatne presvlake za pripremu uzoraka za SEM

Tokom izvedbe ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kulture bakterija:

- *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923

Tokom izvedbe ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- Analitička vaga, XS 205 DU/A (Mettler Toledo)
- Elipsometar, L116B-USB (Gaertner Scientific Ellipsometer)
- pH-metar, 826 pH mobile (Metrohm)
- Uređaj za određivanje hidrodinamičkog promjera i elektroforetske mobilnosti čestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation)
- Pretražni elektronski mikroskop, JEOL JSM-IT500 (Oxford Instruments, Japan)
- Mikroskop atomskih sila, Multimode 8 (Bruker)
- Sonda za mikroskop atomskih sila, NCHV-A (Bruker)
- SurPASS Electrokinetic Analyzer, (Anton Paar GMBH, Austrija)
- Profilometar (Taylor Hobson Precision, Surtronic 25 France)
- Optički tenziometar Theta Lite (Attension, Švedska)
- Uređaj za presvlačenje uzoraka zlatnim folijama za SEM, Quorum, model Q150T (Laughton, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Tokom izvedbe ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći programi:

- OneAttension (Biolin Scientific, Švedska)
- ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, SAD)
- SurPASS, Attract 2.0 (Anton Paar GMBH, Austrija)
- Program za elipsometrijska mjerenja i obradu podataka, Gaertner Ellipsometer Measurement Program v. 8.071 (Gaertner)
- Program za snimanje mikroskopom atomskih sila, Nanoscope 9.7 (Bruker)
- Program za obradu AFM snimki, Nanoscope Analysis 2.0 (Bruker)

Računalni program za obradu podataka, Excel (Microsoft)

3.2. Metode

3.2.1. Mjerenje pH i kalibracija elektrode

Za sva pH mjerenja korištena je kombinirana elektroda. Prije svakog seta mjerenja pH elektroda je kalibrirana uz pomoć pH metra i standardnih pufera. Korišteni puferi bili su pri pH = 3,0, 5,0, 7,0, 9,0.

Kombinirana spojena je na pH metar, uronjena u standardne pufere, a očitana elektromotivnost. Elektromotivnost dovodi se u korelaciju s pH prema Nernstovoj jednadžbi:

$$E_{EMF} = E^0 + E_{ref} - \frac{(RT \ln 10)}{F} pH \quad (12)$$

Prema Nernstovoj jednadžbi radi se linearna regresija. Ukoliko je koeficijent determinacije odnosno vrijednost r^2 , dovoljno blizu 1, elektroda je baždarena.

Nakon kalibracije, pH vrijednosti izračunate su iz izmjerenih elektromotivnosti u raznim otopinama. Sve su otopine priređene u deioniziranoj vodi ($\kappa \leq 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$) koja je proizvedena pomoću Millipore MilliQ Advantage A10 sustava. Svaki pH mjeren je pri 25°C.

3.2.2. Priprema supstrata: suspenzija nanočestica SiO_2 i ravne pločice SiO_2

Supstrati korišteni u ovom radu bile su silicijske pločice koje se spontano presvlače oksidnim slojem te nanočestice SiO_2 ($d = 80 \text{ nm}$). Silicijske pločice rezane su dijamantnom iglom na dimenzije od $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ i $1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ (ovisno o eksperimentu). Prije svakog eksperimenta, silicijske pločice bile su tretirane piranha otopinom koja se sastoji od

koncentrirane sumporne kiseline i vodikovog peroksida u volumnom omjeru 3:1 kako bi se uklonila sva rezidualna organska materija sa supstrata.

3.2.3. Priprema otopina

Prvo je pripremljena suspenzija SiO₂ nanočestica ($\gamma = 4$ g/L), otopina kitozana (CS) u smjesi vode i ledene octene kiseline ($\gamma = 4$ g/L, pH $\approx 3,0$), otopina poli(akrilne kiseline) (PAA) u smjesi vode i octene kiseline ($\gamma = 4$ g/L, pH $\approx 2,8$) i otopina lizozima (Lys) ($\gamma = 4$ g/L). Svako od navedenih otopina namješten je pH pomoću ledene octene kiseline kako bi mu vrijednost iznosila otprilike pH $\approx 3,0$ odnosno pH $\approx 2,8$.

3.2.4. Priprema polielektrolitnih višeslojeva na SiO₂ nanočesticama

Polielektrolitni višeslojevi adsorbirani su na nanočestice silike ($d = 80$ nm) u nekoliko koraka. U idućem koraku pomiješana je suspenzija SiO₂ nanočestica s otopinom kitozana u Falcon epruveti i suspenzija je miješana na rotirajućoj miješalici 15 minuta. Nakon miješanja smjese polielektrolita i SiO₂ čestica, dobivena suspenzija je stavljena na centrifugu pri 4900 okretaja u minuti na 10 minuta. Rezultirajući supernatant je odstranjen, a talog je ispran 2 puta s po 5 mL miliQ vode i centrifugiran nakon svakog od ispiranja. Nakon toga, talog je resuspendiran s otopinom PAA i miješan 15 minuta, zatim centrifugiran 10 min, ispran dva puta s po 5 mL miliQ vode i ponovo centrifugiran 5 minuta.

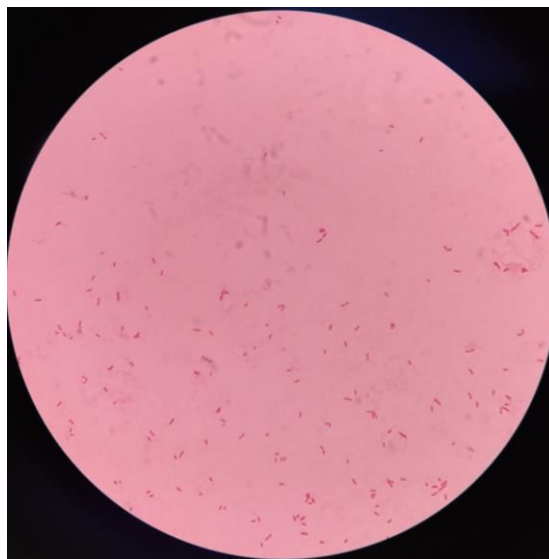
Drugi korak je ponovljen sve dok nanočestice silike nisu bile tretirane otopinom CS tri puta. Konačni talog je resuspendira u 5 mL mili Q vode i podijeljen u dvije „falkonice“ s po 2,5 mL suspenzije. U prvu od te dvije „falkonice“ dodano je 5 mL otopine lizozima, miješano 15 min, ispirano dva puta s po 5 mL i centrifugirano nakon 5 min. Talog iz druge „falkonice“ resuspendiran je otopinom PAA i miješan 15 min, centrifugiran 10 min, ispiran dva puta s po 5 mL mili Q vode i centrifugiran 5 min. Nakon tretmana s otopinom PAA, talog iz druge „falkonice“ pomiješan je s 5 mL otopine lizozima, zatim miješan 15 min, centrifugiran 10min, ispiran dva puta s po 5 mL vode i centrifugiran dva puta po 5 min.

3.2.5. Priprema polielektrolitnih višeslojeva na pločicama SiO_2

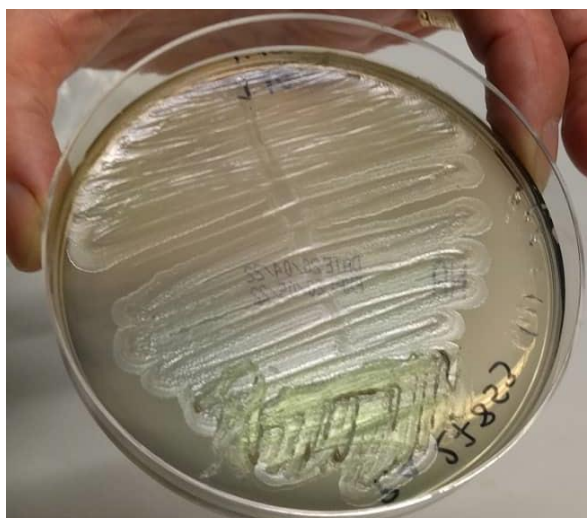
Polielektrolitni višeslojevi pripremljeni su LbL metodom koja je ranije opisana u literaturnom pregledu. Pločice supstrata umočene su u otopine CS ($\gamma = 4$ g/L) i PAA ($\gamma = 4$ g/L) 15 min. Nakon svakog tretmana polielektrolitnom otopinom, pločice su ispirane tri puta s po 25 mL mili Q vode. Prvo ispiranje trajalo je 3 min, dok su konsektivna dva bila u trajanju od 1 min. Ova procedura je ponovljena 9 ili 10 puta što je rezultiralo višeslojevima kojima je terminirajući sloj CS i višeslojevima kojima je terminirajući sloj PAA. Oba nastala višesloja (CS- i PAA-terminirajući) tretirana su uranjanjem u otopinu lizozima ($\gamma = 4$ g/L). Na taj način dobivena su četiri glavna uzorka za karakterizaciju površinskih svojstava i bakterijske adhezije: 1)(CS-PAA)₄-CS, 2) (CS-PAA)₅, 3) (CS-PAA)₄-CS-Lys i 4) (CS-PAA)₅-Lys.

3.2.6. Adhezija bakterija

Za adhezijski eksperiment, korišteni su klinički izolati standardnih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *S. aureus* ATCC 25923. *P. aeruginosa* je aerobna Gram negativna štapičasta bakterija duga između 1 i 5 μm i promjera između 0,5 i 1 μm (slika 31.). *S. aureus* je Gram pozitivna sferična bakterija veličine 0,5 i 1,5 μm u promjeru. Prije rada, stol je steriliziran, te je otvoren plamen koji je služio za sterilizaciju instrumenata u daljnjim koracima. Iz Petrijeve zdjelice u kojoj se nalazi željeni soj bakterija (slika 32.) pomoću sterilne (ali ohlađene) eze hvatalo se nekoliko pojedinačnih kolonija bakterija koje sadrže veliki broj bakterijskih stanica koje se mogu razmnožavati dijeljenjem i tvoriti koloniju (engl. *colony forming unit*, CFU). Pojedinačne kolonije prenijelo se na hranjivi agar (engl. *nutrient agar*, NA) u drugoj sterilnoj Petrijevoj zdjelici. Prijenos je napravljen razmazivanjem "cik-cak" pokretima po agaru bakterija koje su se prethodno sakupile pomoću eze. Rubove poklopca Petrijeve zdjelice držalo se na trenutak iznad plamena kako bi se spriječila eventualna kontaminacija. Pripremljena Petrijeva zdjelica stavljena je u termostatsku komoru na inkubaciju pri 37 °C.



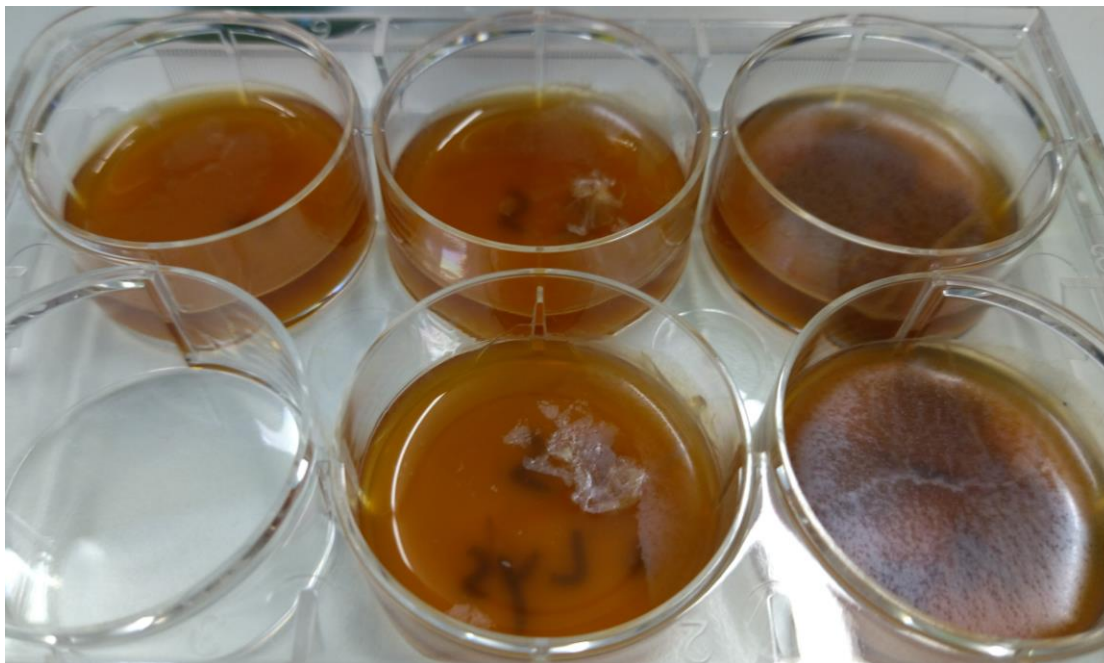
Slika 31. Slika bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 nakon metode bojanja po Gramu



Slika 32. Petrijeva zdjelica s kliničkim izolatom standardnog soja bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853

Nakon inkubacije pipetirano je 5 ml hranjive otopine (engl. *Brain-heart infusion*, BHI) u „falcon“ epruvetu pomoću sterilnog nastavka za pipetiranje. Zatim se iz Petrijeve zdjelice u kojoj su se formirale kolonije pomoću sterilnog eze sakupilo nekoliko kolonija te se eze umočio i promiješao u BHI otopini. „Falcon“ epruveta je zatvorena te je sadržaj promiješan uz pomoć vorteksa. Pripremljena otopina je stavljena u termostat na 18 h pri 37 °C te je tako nastala prekonoćna kultura. Ona je kasnije promiješana na vorteksu, iz nje je otpipetirano 0,133 mL suspenzije koja je zatim ubačena u 40 mL BHI čime se dobila razrjeđena prekonoćna kultura (1:300). Razrjeđena kultura je promiješana pomoću vorteksa.

S po 5 mL razrjeđene kulture punjene su jažice u koje su stavljeni uzorci koji su prethodno sterilizirani uz pomoć UV svjetla. Jažice sa suspenzijom i uzorcima (slika 33.) stavljeni su u termostat na 18 h pri 37 °C.



Slika 33. Slika uzoraka u razrjeđenoj kulturi u jažicama nakon termostataranja. Vidljiv biofilm na površini suspenzije.

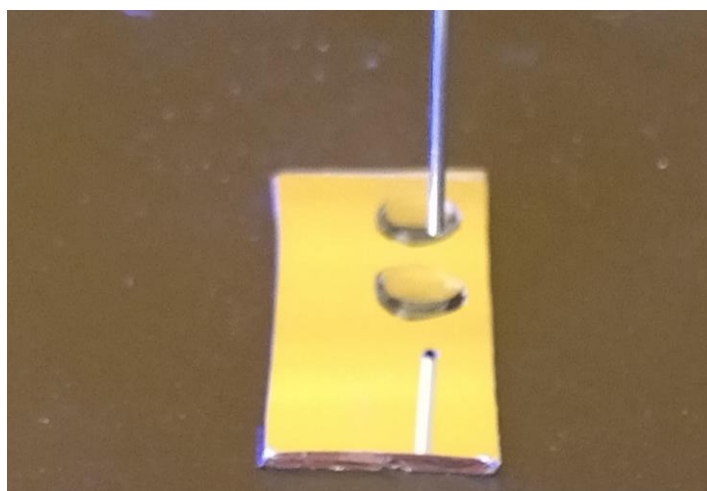
Pripremljeni uzorci (Si/SiO₂ (kontrolni uzorak), (CS-PAA)₄-CS, (CS-PAA)₅, (CS-PAA)₄-CS-Lys, (CS-PAA)₅-Lys) sterilizirani su pomoću UV svjetlosti po 30 min sa svake strane. Uzorci su vađeni sterilnom pincetom te su ispirani po tri puta s po 5 mL otopine fosfatnog pufera (engl. *Phosphate Buffer Solution*, PBS) nakon čega su uzorci sušeni pri povišenoj temperaturi (60 °C) tijekom 10 min kako bi se na njih fiksirale bakterije. Nakon prvog sušenja uzorci su ispirani tri puta s po 5 mL miliQ vode. Bakterije su na taj način fiksirane, a uzorci su pripremljeni za obavljanje zlatnim filmom i snimanje pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM-om). Eksperimenti vezani uz pripremu bakterija i bakterijsku adheziju provedeni su na instituciji: *Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana*, uz pomoć prof. dr. sc. Anamarije Zore.

3.2.7. Tenziometrija

Theta Lite optički tenziometar (Attension, Švedska) korišten je za određivanje kontaktnog kuta položene kapi vode na Si/SiO₂ pločici. Mala kap vode (5 μL) postavljena je na supstrat korištenjem hamiltonke (slika 34.). Veličina kapi računata je aproksimativno na računalu u programu - OneAttension pomoću Young-Laplaceove jednadžbe (13) gdje se međupovršinska napetost koristi za određivanje volumena i oblika kapi:

$$\gamma = \frac{\Delta\rho g R_0}{\beta} \quad (13)$$

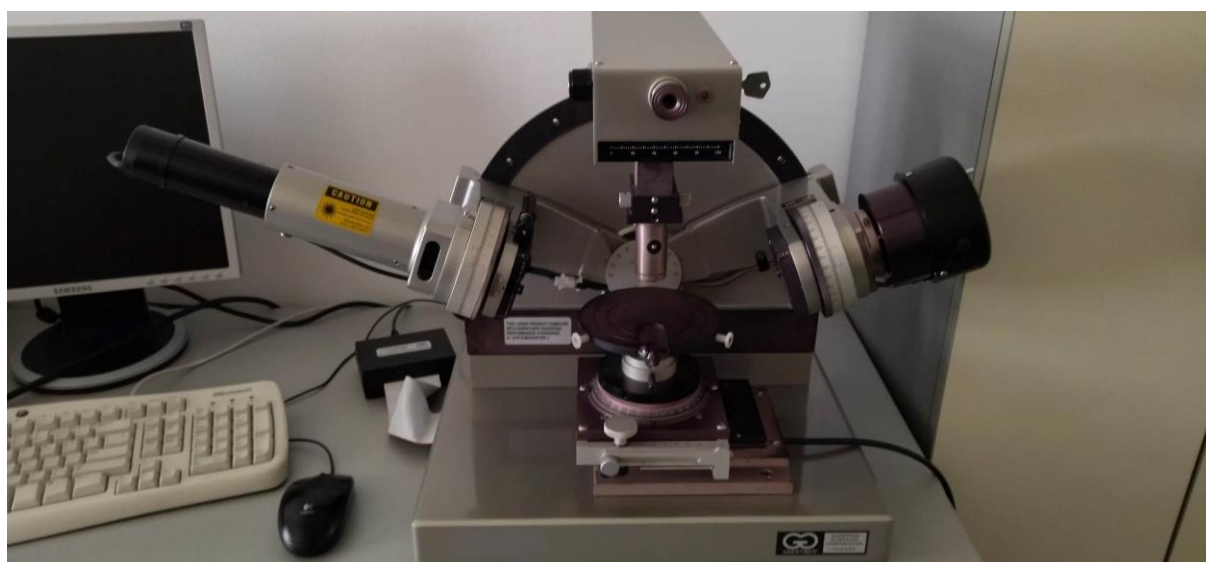
pri čemu je γ površinska napetost, $\Delta\rho$ razlika u gustoći fluida, g gravitacijska konstanta, R_0 je radijus zakrivljenosti kapi na vrhu, a β je faktor oblika kapi. Slika profila kapi snimljena je digitalnom kamerom koja ima izvor svjetlosti sa suprotne strane kapi. Kut između supstrata i polegnute kapi je određen pomoću Youngove jednadžbe (jednadžba (11)) na računalu u programu OneAttension. Tenziometar je redovito kalibriran korištenjem kuglice od volframovog karbida (WC). Tenziometrijski eksperimenti provedeni su u prostoriji stalne temperature od 25 °C i relativne vlažnosti zraka između 30 i 40%. Mjerenje je provedeno kroz 10 s, tijekom kojeg vremena je snimljeno 300 snimki odnosno 30 slika u sekundi, (engl. *Frames per second*, FPS). Broj mjerenja odgovara broju slika između 3. i 10. sekunde, a prema tome broju je računata i standardna pogreška.



Slika 34. Metoda polegnute kapi na uzorku

3.2.8. Elipsometrija

Za karakterizaciju debljine naših uzoraka i njihovih indeksa loma korišten je elipsometar L116B-USB (*Gaertner Scientific*) (slika 35.). Na svakom uzorku je načinjeno mjerenje na 20 različitih mjesta na površini. Mjerenja su provedena uz He-Ne laser ($\lambda = 632,8$ nm) pri upadnom kutu zračenja od 70° . Model filma koji je korišten u računalnom programu (*Gaertner Ellipsometer Measurement Program v. 8.071*) bio je model četverosloja koji se sastojao od silicija s oksidnim slojem. Na površini oksidnog sloja nalazio se film u okruženju zraka. Korišteni su sljedeći parametri: indeks loma zraka ($n = 1,000$), debljina oksidnog sloja na siliciju koja je izmjerena u prvom elipsometrijskom eksperimentu i indeks loma silicijeva dioksida ($n = 1,47$). Realni i imaginarni dio indeksa loma silicija iznosili su ($n = 3,87$ i $k = 0,016$). Elipsometrijski eksperimenti provedeni su u prostoriji stalne temperature od 25 °C i relativne vlažnosti zraka između 30 i 40%.



Slika 35. Elipsometar Gaertner Scientific Ellipsometer L116B-USB

3.2.9. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti

Elektroforetske pokretljivosti čistih nanočestica silike i nanočestica silike s adsorbiranim slojevima polielektrolita određene su pomoću instrumenta Brookhaven 90 Plus Particle Size Analyzer and Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, SAD) (slika 36.) pri 25 °C. Instrument mjeri Dopplerov pomak u angularnim frekvencijama ($\Delta\omega$) i primijenjeno električno polje E . λ predstavlja upadnu valnu duljinu, a n je indeks loma medija.

$$\Delta\omega = \left(\frac{2\pi n}{\lambda}\right) E \sin\theta \quad (14)$$

Nakon svakog tretmana SiO₂ nanočestica otopinama polielektrolita mjerene su elektroforetska pokretljivost i zeta potencijal nanočestica. Mala količina taloga iz „falkonice“ prebačena je u kivetu, napunjena s 1,4 mL 0,1 mol dm⁻³ octene kiseline. Kiveta je stavljena u uređaj te je izmjeren ζ -potencijal. Zeta potencijal je računat iz mjerenih elektroforetskih pokretljivosti korištenjem jednadžbe prema Smoluchowskom, gdje je ϵ_r relativna permitivnost, ϵ_0 je električna permitivnost vakuuma a η je viskoznost.

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\epsilon_0\epsilon_r} \quad (15)$$

Sva mjerenja su izvedena pri 25 °C te pri kutu raspršenja od 90° u odnosu na upadno zračenje. Valna duljina pri kojoj je mjereno raspršenje iznosila je 659,0 nm, a za svako pojedino mjerenje trebalo je 128 μ s.



Slika 36. Instrument za mjerenje dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (Brookhaven 90 Plus Particle Size Analyzer i Zeta Potential Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation)

3.2.10. Mikroskop atomskih sila

U svrhu istraživanja površinske morfologije i karakterizaciju površinske topografije polielektrolitnog višesloja korišten je mikroskop atomskih sila Multimode-8, Bruker (slika 37.). U sklopu istraživanja evaluirana je prekrivenost supstrata i određena hrapavost površine PEM-a. Proba korištena za dobivanje AFM snimaka bila je NCHV-A (Bruker).

Uzorci PEM-ova pripremljeni su na silicijevoj pločici 1 cm x 1 cm. Na uzorcima napravljeno je nekoliko zarezaka kako bi se odredila debljina filma. Svaki od uzoraka je snimljen na pet različitih mjesta na površini. Uzorak je sniman u dinamičnom načinu rada pri ambijentalnoj temperaturi od oko 25 °C i relativnoj vlažnosti od 20 do 40 %. U računalnom programu (Nanoscope 9.7) podešena je veličina snimanja na 5 x 5 μ m², brzina pretraživanja postavljena

je na 1 Hz. AFM snimke obrađene su u računalnom programu (Nanoscope Analysis 2.0) gdje su uklonjeni šumovi te je izvršena funkcija „flatten“ prvog reda kako bi se otklonio nagib uzorka. Za svaku od AFM snimki određeni su parametri hrapavosti (R_a , R_q i Wenzelov koeficijent), a površinska prekrivenost (Q) određena je pomoću „bearing“ analize na dubini od 0 nm.

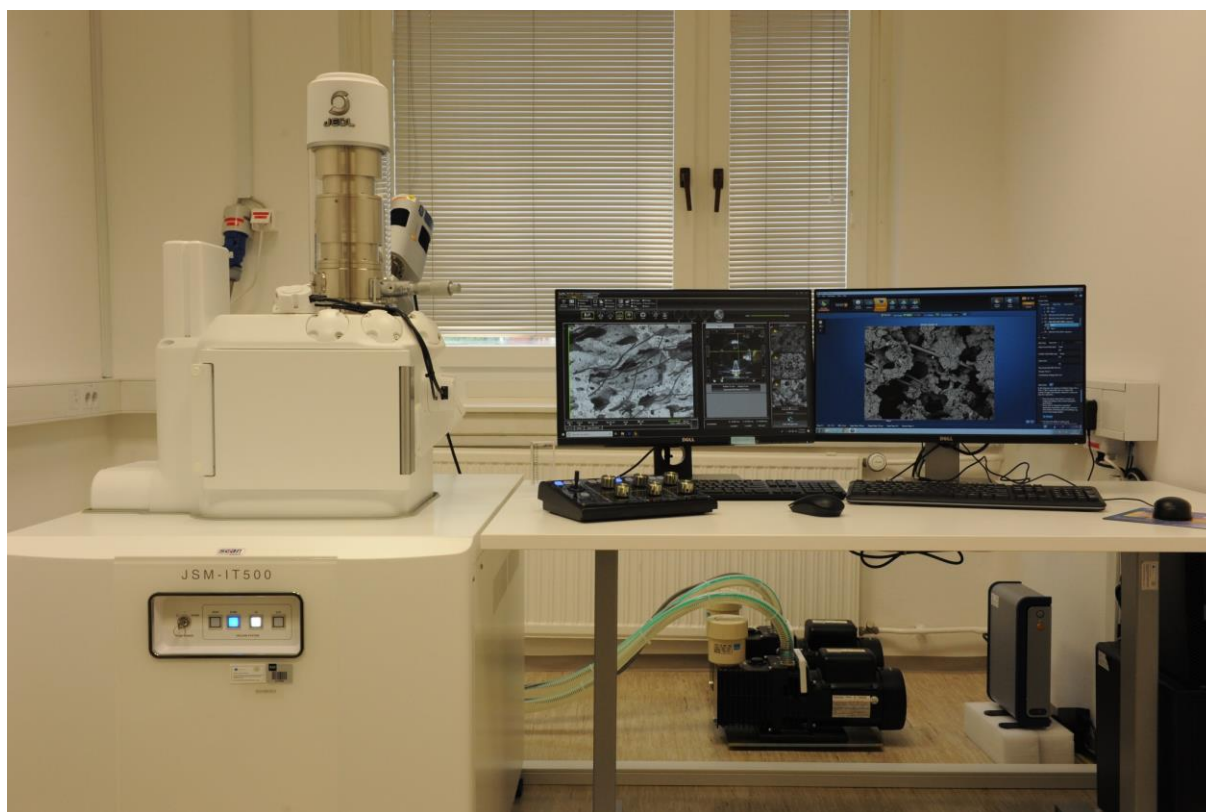


Slika 37. Mikroskop atomskih sila (Multimode 8, Bruker)

3.2.11. Pretražni elektronski mikroskop

Adhezija bakterija na uzorke istraživana je korištenjem pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM) JEOL JSM-IT500 (Oxford Instruments, Japan) (Slika 38.). Slike su snimane u modu visokog vakuuma, s radnom udaljenošću od 10 mm i ubrzanim naponom od 10 kV. Slike su snimane sa sekundarnim elektronskim detektorom (SED). Uzorci su postavljeni na dvostranu ugljičnu traku i dodatno presvučeni zlatom prije snimanja. Za presvlačenje korišten je Quorum, model Q150T (Laughton, Ujedinjeno Kraljevstvo). Debljina zlatne presvlake iznosila je 20 nm. Eksperimenti vezani uz pretražnu elektronsku mikroskopiju provedeni su na instituciji:

Slovenian National Building and Civil Engineering Institute u Ljubljani, uz pomoć dr. sc. Andreja Pondelak i dr. sc. Andrijana Sever Škapin.



Slika 38. Pretražni elektronski mikroskop JEOL JSM-IT500 s EDS analizatorom. Preuzeto iz (53)

3.2.12. Mjerenja potencijala strujanja polielektrolitnih višeslojeva na ravnoj površini SiO₂

Za mjerenja potencijala strujanja ravne površine korišten je instrument SurPASS Electrokinetic Analyzer, (Anton Paar GMBH, Austrija) (slika 39.). Priprema uzoraka započela je vrlo preciznim rezanjem, a zatim i brušenjem pločica silicija na 1 cm x 1 cm veličinu. Na dobivenim pločicama pripremljeni su PEM-ovi. Pločice s PEM-ovima montirali smo na nosače te ih stavili u komoru za eksperiment potencijala strujanja na udaljenost od 100 μm . Pripremljene su otopine od 0,01, 0,1 i 1 mol dm⁻³ NaOH i HCl te su stavljene u posebne komore iz kojih se pomoću sustava pumpi uzimaju i guraju u reakcijsku ćeliju. Instrument automatski mjeri pH na ulazu i izlazu iz reakcijske cijevi, a nakon što pH postane stabilan vrijednost zeta potencijala se očitava u SurPASS, Attract 2.0 (Anton Paar GMBH, Austria) programu. Eksperiment kreće na način da se mjeri zeta potencijal u kiselom, nakon čega se u sustav dodaju različiti volumeni baza kako bi se izmjerio zeta potencijal pri različitim pH-vrijednostima. Eksperiment je proveden pri 25 °C.



Slika 39. Uređaj za mjerenje potencijala strujanja - SurPASS Electrokinetic Analyzer, (Anton Paar GMBH, Austrija)

3.2.13. Profilometrija

Profilometarska mjerenja provedena su uz pomoć instrumenta profilometer (Taylor Hobson Precision, Surtronic 25) (slika 40.). Pripremljene uzorke potrebno je staviti na ravnu površinu. Profilometar je potrebno približiti tako da proba profilometra bude iznad uzorka. S profilometrom je potrebno izvesti 5 mjerenja uzduž i popreko kako bi se dobili parametri hrapavosti R_a i R_q . Instrument je spojen s računalom, na kojem se uz pomoć programa TalyProfile mogu isčitati željeni parametri hrapavosti. Eksperimenti su provedeni pri 25 °C i 30% relativne vlažnosti zraka. Profilometrijska mjerenja provedena su na instituciji: *Slovenian National Building and Civil Engineering Institute, Ljubljana*, uz pomoć dr. sc. Andrijane Sever Škapin i dr. sc. Andreje Pondelak.



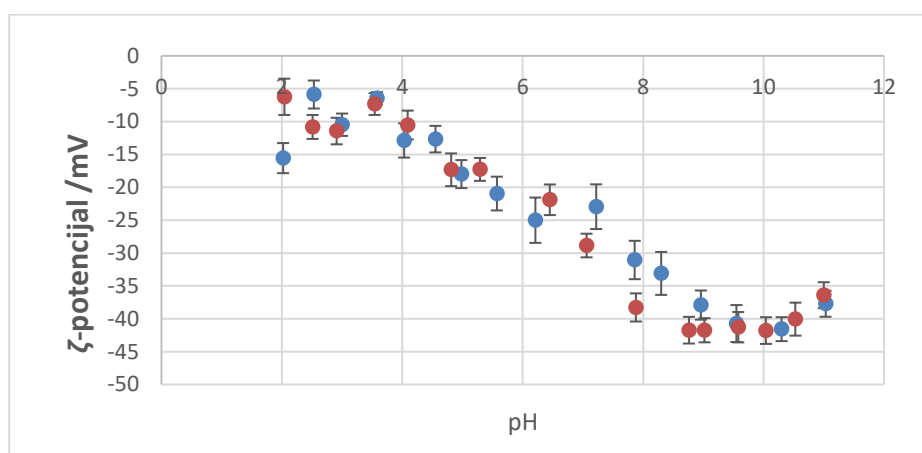
Slika 40. Profilometar Taylor Hobson Precision, Surtronic 25 France, 2010. Preuzeto iz (54)

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

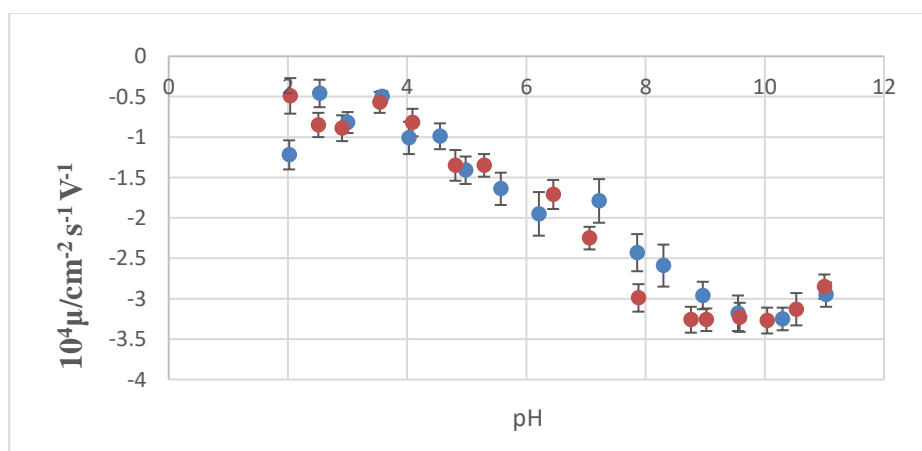
4.1. Karakterizacija površinskog naboja

4.1.1. Određivanje izoelektrične točke nanočestica SiO_2

Izoelektrična točka je pH vrijednost pri kojoj se vrijednost ζ , odnosno elektrokinetičkog potencijala mijenja iz pozitivnog predznaka u negativan, odnosno to je točka u kojoj on iznosi 0. Mikroelektroforetskim mjerenjima određena je pokretljivost nanočestica silike u koloidnim suspenzijama različitih pH-vrijednosti. Prvo mjerenje bilo je pri $\text{pH} = 2$, zatim se dodavanjem različitih volumena NaOH u suspenziju povećavao pH i pratila se pokretljivost te ζ -potencijal SiO_2 nanočestica (slike 41. i 42.).



Slika 41. Elektrokinetički potencijal SiO_2 nanočestica ($\gamma = 2 \text{ g dm}^{-3}$) u ovisnosti o pH



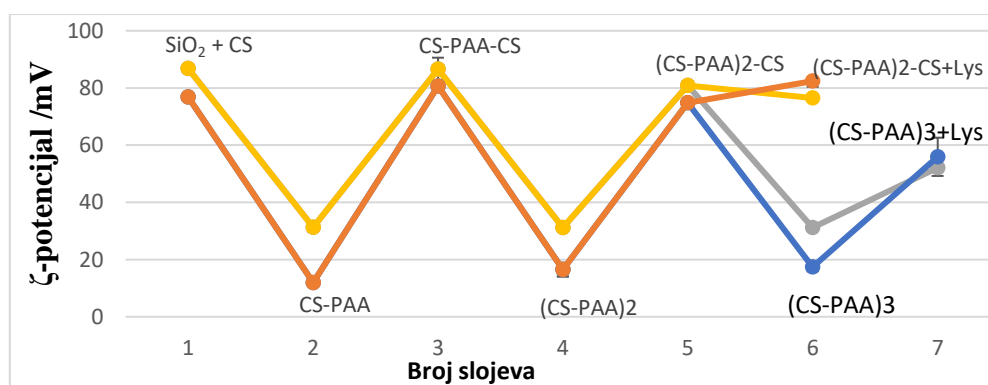
Slika 42. Elektroforetska pokretljivost SiO_2 nanočestica ($\gamma = 2 \text{ g dm}^{-3}$) u ovisnosti o pH

Izoelektrična točka očitana je sa slike i iznosi $\text{pH}_{\text{iep}} \approx 2$, a iznad $\text{pH} = 2$ mobilnost i ζ -potencijal imaju negativne vrijednosti. Isti rezultat opisan je ranije u literaturi za nanočestice silike kojima je promjer 80 nm.⁵⁵ Određivanje izoelektrične točke na nanočesticama silike bitno je zato što su po sastavu iste kao i primarni supstrat koji je korišten tijekom eksperimenata, a to su bile pločice silicija s nativnim oksidnim slojem. Izoelektrična točka silike govori nam da će pri svakoj pH-vrijednosti iznad $\text{pH} = 2,0$ površina biti negativno nabijena, zbog čega naše eksperimente možemo provoditi pri relativno niskim pH-vrijednostima ($\text{pH} = 3,0$), a kitozan se može značajno protonirati i služiti kao prvi polielektrolit koji će se adsorbirati direktno na površinu. Nakon adsorpcije kitozana, zbog relativno niske pH-vrijednosti, očekujemo da će on ne samo kompenzirati naboj na površini već da će zbog njegove adsorpcije površina postati pozitivno nabijena i pružiti platformu za daljnje vezanje polielektrolita – polianiona poli(akrilne kiseline).

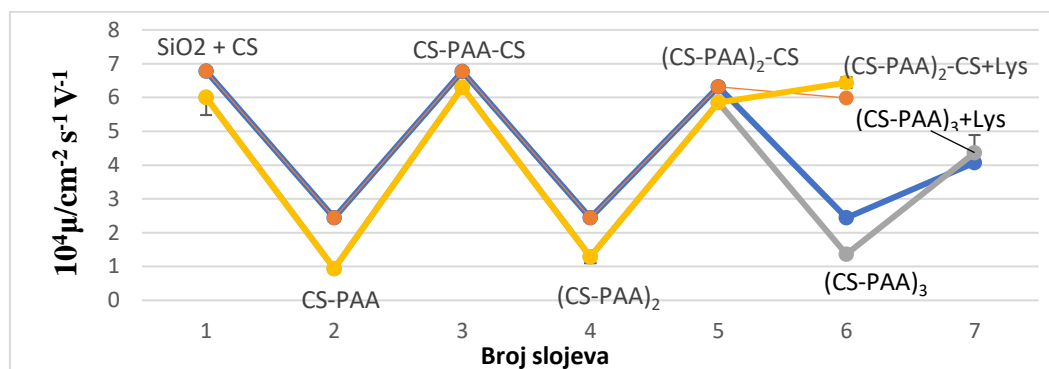
4.1.2. Pokretljivost SiO_2 nanočestica prekrivenih polielektrolitnim višeslojevima

Sljedeća elektroforetska mjerenja provedena su nakon nanošenja polielektrolita na nanočestice silike kao što je to i opisano u poglavlju Materijali i metode. Svi izmjereni zeta potencijali i mobilnosti bili su pozitivni, kao što se to može vidjeti na slikama 43. i 44. Nakon prvog nanošenja kitozana na nanočestice one su postale pozitivno nabijene. Pozitivan naboj omogućava vezanje polianiona, stoga nakon vezanja drugog sloja polielektrolita koji je bio PAA primjećen je značajni pad u mobilnosti i potencijalu nanočestica silike. Pad potencijala bio je nedovoljan da nakon vezanja poli(akrilne kiseline) površina bude negativno nabijena, ali kako je pad značajan sa sigurnošću možemo pričati o tome da se poli(akrilna kiselina) vezala na nanočestice silike koje su prethodno bile tretirane kitozanom. Ovakav rezultat govori nam da PAA nije potpuno prekrila naboj kitozana već da je došlo samo do djelomičnog prekrivanja što može značiti da je PAA djelomično protonirana zbog uvjeta u kojoj se eksperiment provodio ($\text{pH} = 3,0$). Treći sloj bio je opet CS, čija adsorpcija je očekivano vratila potencijal na vrijednost sličnu onoj iz prvog sloja. Ovaj događaj indicira da je unatoč prevladavajućem pozitivnom naboju, na površini bilo negativnog naboja koji je poslužio za vezanje kitozana. Četvrti sloj opet je bio PAA, adsorpcija se dogodila uz promjenu potencijala, a njegova vrijednost imala je sličan iznos kao i nakon prve adsorpcije PAA. Eksperimenti koji su uslijedili dali su slične rezultate kao i za prva četiri sloja, te su tako potvrdili da je PEM moguće kreirati na našem supstratu. Peti sloj, opet je pokazivao svojstva kao za 1. i 3. 5. sloj bio je mjesto grananja eksperimenta. Nakon petog sloja nanočestice su bile podijeljene u dvije zasebne „falkonice“

kao što je to opisano ranije u materijalima i metodama. Na prvu polovicu nanočestica s 5 slojeva polielektrolita adsorbiran je lizozim direktno i kao što je očekivano nije bilo značajne promjene u naboju, ali ona je i dalje bila vidljiva. Ova mala promjena može se pripisati relativno visokoj izoelektričnoj točki lizozima ($pH_{iep} = 10,6 - 10,9$) zbog čega je on pozitivno nabijen ispod te vrijednosti. Mala promjena koja se ipak nalazi izvan standardne pogreške može se objasniti vezanjem lizozima vodikovim vezama, ali i njegovim vezanjem na neprekrivene lance PAA što nam dijelom može dati i informacije o strukturi našeg polielektrolitnog višesloja. U drugom slučaju, polielektroliti su u PEM-u isprepleteni, odnosno PAA može izbiti na površinu te na taj način pružiti mjesto vezanja lizozima. Druga polovica nanočestica tretirana je s PAA, nakon čega je vrijednost pala na sličnu drugom i četvrtom sloju koji su također imali PAA kao terminirajući polielektrolit. Takve nanočestice: $(CS-PAA)_3$ bile su tretirane lizozimom te je došlo do značajne promjene u naboju. Ovakav događaj može se okarakterizirati kao elektrostatsko vezanje lizozima za površinu jer je PAA negativno nabijeni polielektrolit. Mjerenjem elektroforetskog raspršenja pokazali smo da se naši polielektroliti vežu za nanočestice silike i da se lizozim može vezati na oba terminirajuća polielektrolita na površini našeg polielektrolitnog višesloja. Nakon eksperimenata mjerenja elektroforetske pokretljivosti nanočestica silike, potvrdili smo da je PEM moguće pripremiti na SiO_2 . Međutim zbog istraživanja moguće primjene potrebno je promotriti vezanje polielektrolita na ravnu površinu. Supstrat, odnosno ravnu površinu u ovom slučaju predstavljaju pločice silicija koje se na zraku spontano prekrivaju slojem oksida (SiO_2). Za početak, potrebno je promotriti svojstva našeg PEM-a na površini supstrata kako bi mu mogli objasniti antiadhezijska i antibakterijska svojstva. Kako smo već krenuli s karakterizacijom površinskog naboja, dobro je promotriti kako on ovisi o pH za istraživani sustav.



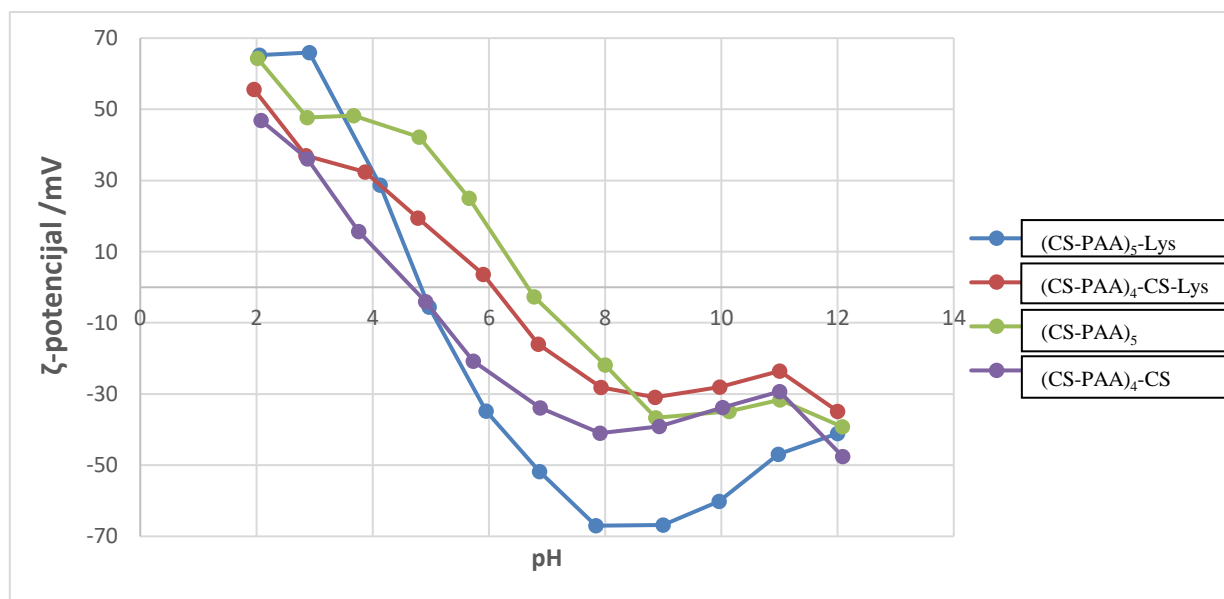
Slika 43. ζ -potencijal SiO_2 nanočestica u ovisnosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita ($CS(\gamma = 4 \text{ g/L})$, $PAA(\gamma = 4 \text{ g/L})$, $Lys(\gamma = 4 \text{ g/L})$, $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $pH = 3,0$)



Slika 44. Elektroforetska pokretljivost SiO₂ nanočestica u ovisnosti o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita (CS(γ = 4 g/L), PAA(γ = 4 g/L), Lys(γ = 4 g/L), θ = 25 °C, pH = 3,0)

4.1.3. Mjerenje potencijala strujanja SiO₂ pločica prekrivenih polielektrolitima

Kako bi dobili više informacija o površinskom naboju pripremljenih filmova, provedena su mjerenja potencijala strujanja. Elektrokinetički potencijal određen je za međupovršinu PEM/otopina pri različitim vrijednostima pH (slika 45.). Glavne probleme pri mjerenjima potencijala strujanja predstavlja izvedba instrumenta te geometrija mjernog sustava i uzoraka. Dodatan problem predstavlja promjena ionske jakosti, pogotovo pri višim pH-vrijednostima.



Slika 45. Potencijal strujanja uzoraka polielektrolitnih višeslojeva adsorbiranih na Si/SiO₂ pločicu u ovisnosti o pH

Mjerenja su započeta u kiselom pri $\text{pH} = 2,0$ te se dodavanjem otopina NaOH različitih koncentracija postepeno povećavao pH do $\text{pH} = 12,0$. Preko potencijala strujanja može se doći do informacija o zeta potencijalu za filmove na Si/SiO₂ supstratu. Potencijal strujanja mjeren je kao funkcija pH što je prikazano na slici 45.

Svi filmovi pokazuju izraženu ovisnost zeta potencijala o pH , a uz to svi filmovi pokazuju sličan trend ovisnosti zeta potencijala o pH . S obzirom na to da su i PAA i CS slabi polielektroliti očekivano je da nema značajne razlike u ponašanju s obzirom na to koji polielektrolit je terminirajući sloj. Izraženija promjena zeta potencijala kod oba polielektrolita može se pripisati tome da je utjecaj pH na njihov stupanj ionizacije velik. Za niske pH vrijednosti svi uzorci imaju pozitivan potencijal, što se slaže s rezultatima dobivenim za elektroforetsko raspršenje. Pri $\text{pH} = 2,0$ vidimo da su PEM s kitozonom kao zadnjim slojem ((CS-PAA)₄-CS) i PEM s adsorbiranim lizozimom na kitozan ((CS-PAA)₄-CS-Lys) otprilike pri istom potencijalu, ali onaj s adsorbiranim lizozimom je malo viši. Takav rezultat je u skladu s očekivanjima. S druge strane, potencijali za (CS-PAA)₅ i (CS-PAA)₅-Lys su pri $\text{pH} = 2,0$ vrlo zanimljivi. Ispod $\text{pH} = 3,0$ dolazi do potpune protonacije PAA, te je naboj koji se osjeti na elektrokinetičkoj udaljenosti kod ovog sustava pozitivniji nego za prethodna dva slučaja što je na prvu kontraintuitivno. Očekivano bi bilo da je pozitivan, ali manji. S druge strane ako uzmemo u obzir prethodna razmatranja da je struktura našeg višesloja isprepletana, odnosno da slojevi jednog polielektrolita prodiru u slojeve drugog možemo objasniti dobivene eksperimentalne podatke. Dostupnost amino skupina kitozana za protonaciju na površini PEM-a, omogućivala bi PEM-ovima (CS-PAA)₅ i (CS-PAA)₅-Lys da imaju značajan pozitivni potencijal pri $\text{pH} \approx 2,0$.

Međuodnos PEM-ova pri $\text{pH} \approx 3$ je važan jer se pri istom pH mjerilo elektroforetsko raspršenje svjetlosti. Pri toj pH -vrijednosti (CS-PAA)₅-Lys ima najveću vrijednost zeta potencijala, dok je potencijal (CS-PAA)₅ višesloja nešto manji, a potencijali (CS-PAA)₄-CS i (CS-PAA)₄-CS-Lys su otprilike isti. Izoelektrične točke PEM-ova nalaze se pri $\text{pH} \approx 5$ za filmove (CS-PAA)₄-CS i (CS-PAA)₅-Lys, pri $\text{pH} \approx 6$ za film (CS-PAA)₄-CS-Lys i između $\text{pH} = 6,5$ i $\text{pH} = 7,0$ za (CS-PAA)₅.

U pH području iznad pH_{iep} mjereni elektrokinetički potencijali bili su negativni, a pri $\text{pH} \approx 9$ postignut je plato pri kojem nije bilo značajnih promjena potencijala. Zanimljivo je da je pri $\text{pH} \approx 9,0$ film s najmanjim ζ -potencijalom (CS-PAA)₅-Lys, (CS-PAA)₄-CS-Lys je

očekivano s najvećom vrijednošću ζ -potencijala, a filmovi (CS-PAA)₄-CS i (CS-PAA)₅ su na otprilike istoj vrijednosti potencijala. Jednak naboj na filmovima (CS-PAA)₄-CS i (CS-PAA)₅ dodatno potvrđuje raniju hipotezu da se radi o isprepletenim filmovima bez jasnih granica između slojeva. Zanimljivo, povećanjem pH otopine iznad (CS-PAA)₄-CS za film (CS-PAA)₅-Lys njegov ζ -potencijal raste. Iako se mnogi rezultati ne mogu opisati teorijski, pogotovo nakon izoelektričnih točaka, bitno je napomenuti da se dodavanjem NaOH u sustav značajno povećava ionska jakost koja također igra veliku ulogu u nabijanju površina te konačno utječe i na elektrokinetički potencijal, elektrokinetičku udaljenost, konformaciju polielektrolita i proteina te morfologiju površine filma.

Eksperimenti adhezije bakterija provedeni su pri pH \approx 7,4 (u BHI). Pri toj pH-vrijednosti svi su PEM-ovi negativno nabijeni, iako (CS-PAA)₅ pokazuje najmanji površinski naboj. Kod sprječavanja adhezije bakterija na površinu uzorka bitno je da površina posjeduje određenu količinu bilo pozitivnog bilo negativnog naboja. U literaturnom pregledu spomenuto je da će negativno nabijena površina elektrostatski odbijati bakterije, dok će pozitivno nabijena površina djelovati inhibitorno na bakterije. PEM (CS-PAA)₅ trebao bi po rezultatima mjerenja elektrokinetičkog potencijala pokazivati gotovo električnu neutralnost pri uvjetima adhezije, stoga očekujemo da će taj PEM imati najslabije izražena antibakterijska i antiadhezijska svojstva.

4.2. Debljina polielektrolitnih višeslojeva

4.2.1. Određivanje debljine oksidnog sloja

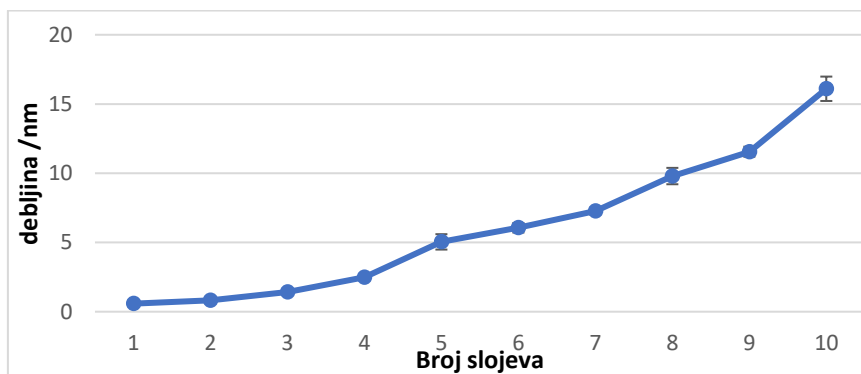
Elipsometrijska mjerenja su prvo provedena na čistom Si/SiO₂ supstratu kako bi se odredila debljina oksidnog sloja. Korištene su literaturne vrijednosti indeksa loma. Realni dio indeksa loma silicija iznosio je $N_s(\text{Si}) = 3,873$, a imaginarni dio $K_s(\text{Si}) = -0,016$. Indeks loma silike bio je 1,457. Debljina oksidnog sloja mjerena je na 10 mjesta na 4 različita supstrata, a dobivene vrijednosti ispisane su Tablici 1. Utvrđeno je da debljina nativnog sloja oksida na površini pločice silicija iznosi oko 2 nm.

Tablica 1. Debljine SiO₂ sloja određene elipsometrijski na nekoliko pločica silicija. a) i b) predstavljaju dva mjerenja iste SiO₂ pločice, a) netom nakon tretmana piranha otopinom, b) dan kasnije. c) i d) predstavljaju mjerenja debljine oksidnog sloja za dvije nezavisne pločice.

Elipsometrijski parametri određivanja debljine	a) Si/SiO ₂	b) Si/SiO ₂	c) Si/SiO ₂	d) Si/SiO ₂
$N_f = 1,46$ (PEM)	d/nm	d/nm	d/nm	d/nm
$N_f(\text{SiO}_2)$	2,60	1,81	2,06	2,26
$N_s(\text{Si}) = 3,873$	2,57	1,90	2,07	2,00
$K_s(\text{Si}) = -0,016$	2,47	1,78	1,76	2,18
	2,48	1,72	2,11	1,97
	2,61	1,80	2,00	2,32
	2,49	1,75	1,91	1,99
	2,43	1,86	1,99	1,99
	2,50	1,83	2,04	2,27
	2,48	2,14	2,044	2,10
	2,59	1,81	1,99	2,56
Srednja vrijednost:	2,52	1,84	1,99	2,16
Standardna pogreška:	0,02	0,04	0,03	0,06

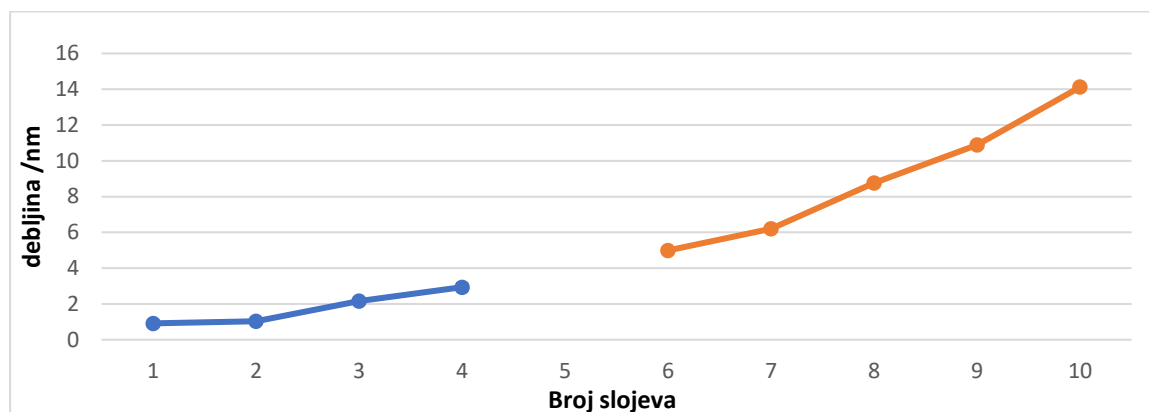
4.2.2. Određivanje debljine polielektrolitnog višesloja

Nakon određivanja debljine oksidnog sloja, nastavljena su elipsometrijska mjerenja debljina polielektrolitnih višeslojeva na silicijskim pločicama. Rezultati su prikazani na slikama 46., 47. i 48. Slika 46. pokazuje neiterativna mjerenja debljine višesloja za svaki adsorbirani sloj. Neparni slojevi su oni koji završavaju s CS, a parni s PAA. Očekivano debljina filma se povećava nakon svakog adsorbiranog sloja što se može vidjeti 46. i 47. Rast CS/PAA filma je između eksponencijalnog i linearnog.



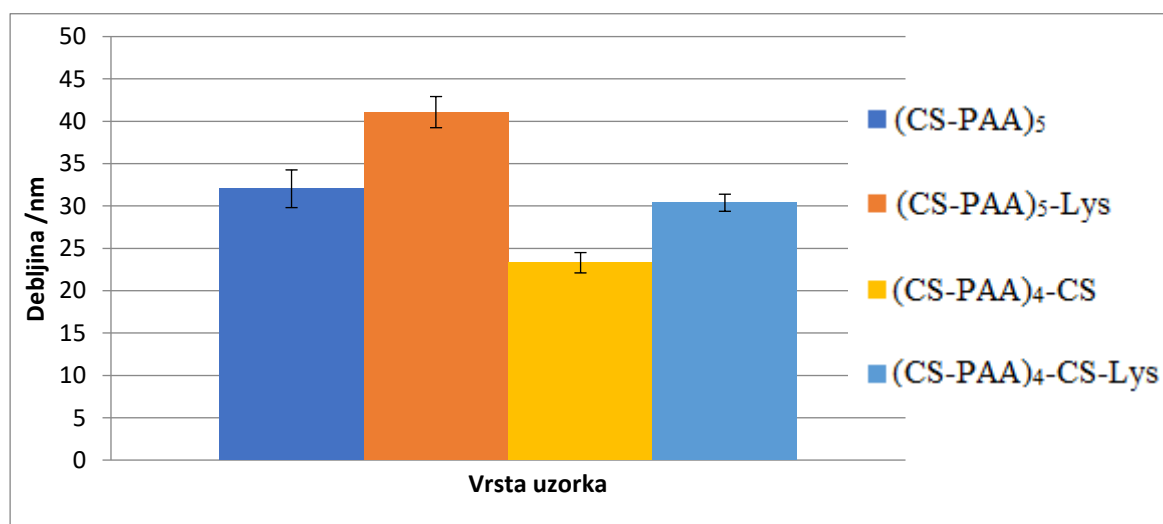
Slika 46. Debljina polielektrolitnog višesloja određena elipsometrijski korištenjem neiterativne metode za svaki sloj adsorbiranog polielektrolita na Si/SiO₂ pločicu ($\theta = 25$ °C).

Iterativna mjerenja korištena su kako bi se odredio indeks loma i debljina svakog adsorbiranog sloja na površinu. Kao što je i očekivano trend rasta nakon svakog sloja bio je sličan onome koji je dobiven korištenjem neiterativne metode mjerenja, s malim razlikama u debljini.



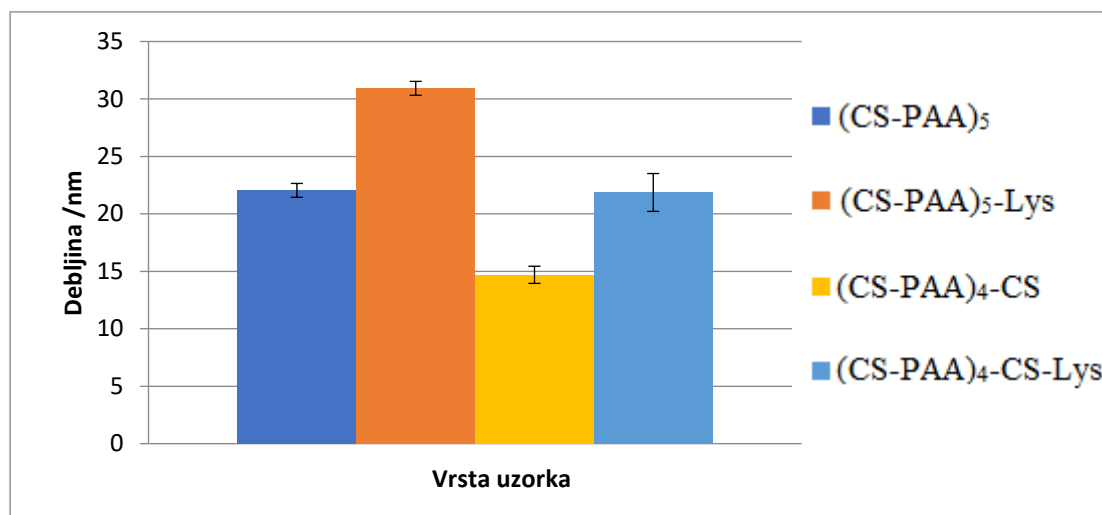
Slika 47. Debljina polielektrolitnih višeslojeva određena elipsometrijski korištenjem iterativne metode za svaki sloj adsorbiranog polielektrolita na Si/SiO₂ pločicu ($\theta = 25^\circ\text{C}$).

Određene su debljine CS/PAA višeslojeva prije i nakon adsorpcije lizozima (slika 48. i 49). CS terminirajući, tj. (CS-PAA)₄-CS bio je najtanji od ispitivanih PEM-ova, slijedi (CS-PAA)₄-CS-Lys, (CS-PAA)₅ i (CS-PAA)₅-Lys. Kao što je i očekivano – PEM s najmanje slojeva ((CS-PAA)₄-CS) bio je najtanji. (CS-PAA)₄-CS-Lys malo je tanji od (CS-PAA)₅ vjerojatno zbog slabijeg vezanja Lys na pozitivno nabijeni CS za razliku od jačeg elektrostatskog vezanja između CS i PAA.



Slika 48. Debljina polielektrolitnih višeslojeva bez i sa završnim slojem lizozima određena elipsometrijski korištenjem neiterativne metode.

Porast debljine filma nakon adsorpcije lizozima na (CS-PAA)₄-CS višesloj može se pripisati različitim vrstama vezanja koje nisu elektrostatske, npr. vodikove veze. Ovaj rezultat u skladu je s mjerenjima zeta potencijala na nanočesticama silike prekrivenim PEM-om (slike 43. i 44.). Rast debljine između (CS-PAA)₅ i (CS-PAA)₅-Lys posljedica je adsorpcije Lys na PAA zbog elektrostatskih interakcija između PAA i Lys.



Slika 49. Debljina polielektrolitnih višeslojeva bez i sa završnim slojem lizozima određena elipsometrijski korištenjem iterativne metode.

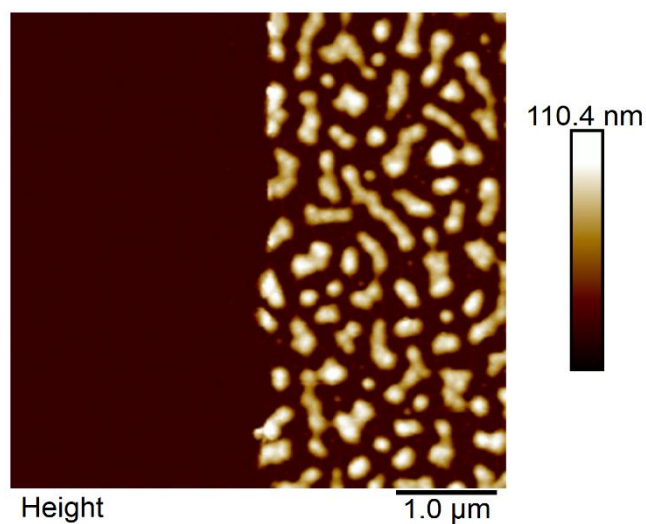
Debljine pripremljenih polielektrolitnih višeslojeva prije i nakon adsorpcije lizozima određene AFM-om prikazane su u Tablici 2. Debljina višeslojeva određena je na zarezu napravljenom pomoću pincete (slike 50. i 51.). Zarez je analiziran sa step funkcijom nakon što je obavljena funkcija „*flatten*“ prvog reda, kako bi se ispravio nagib uzorka. Analiza debljine pokazala je da se debljina uzoraka će se povećavati s brojem slojeva, Jedino je (CS-PAA)₅ PEM dao drugačiji rezultat koji nije u skladu s ostalim rezultatima. AFM snimke tog PEM-a nisu u skladu s teorijom i elipsometrijskim mjerenjima. Ostali višeslojevi imali su značajan rast debljine nakon adsorpcije Lys.

Tablica 2. Debljina četiri vrste PEM-ova dobivena analizom AFM snimke zarez uz pomoć programa *Nanoscope analisis 2.0* (Bruker)

(CS-PAA) ₄ -CS	15,6 nm
(CS-PAA) ₄ -CS-Lys	22,1 nm
(CS-PAA) ₅	10,7 nm
(CS-PAA) ₅ -Lys	23,5 nm



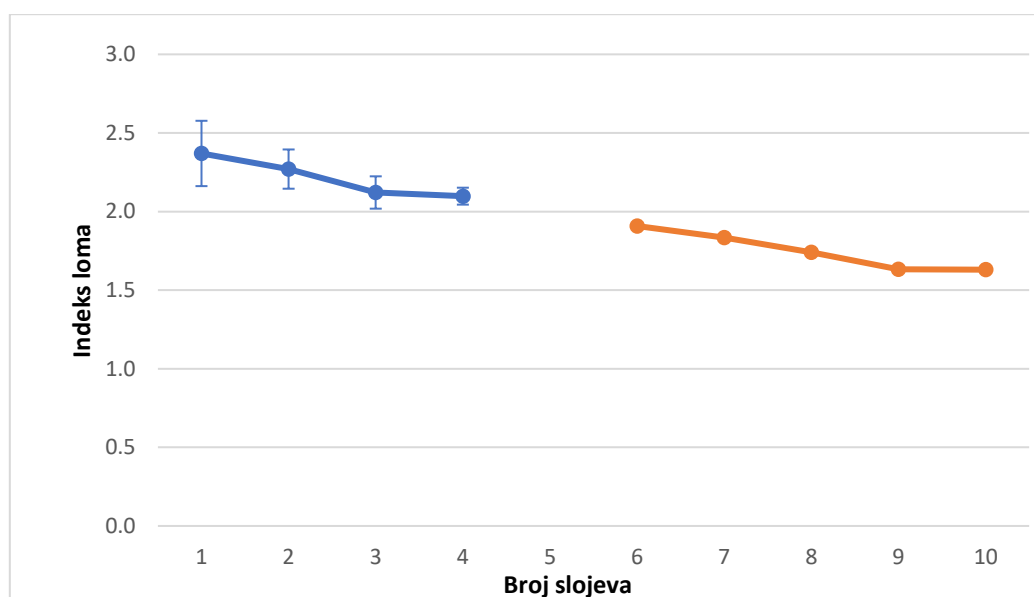
Slika 50. $500 \times 400 \mu\text{m}^2$ mikroskopska slika zareza na PEM-u s lizozimom adsorbiranim na terminirajući sloj PAA ((CS-PAA)₅-Lys)



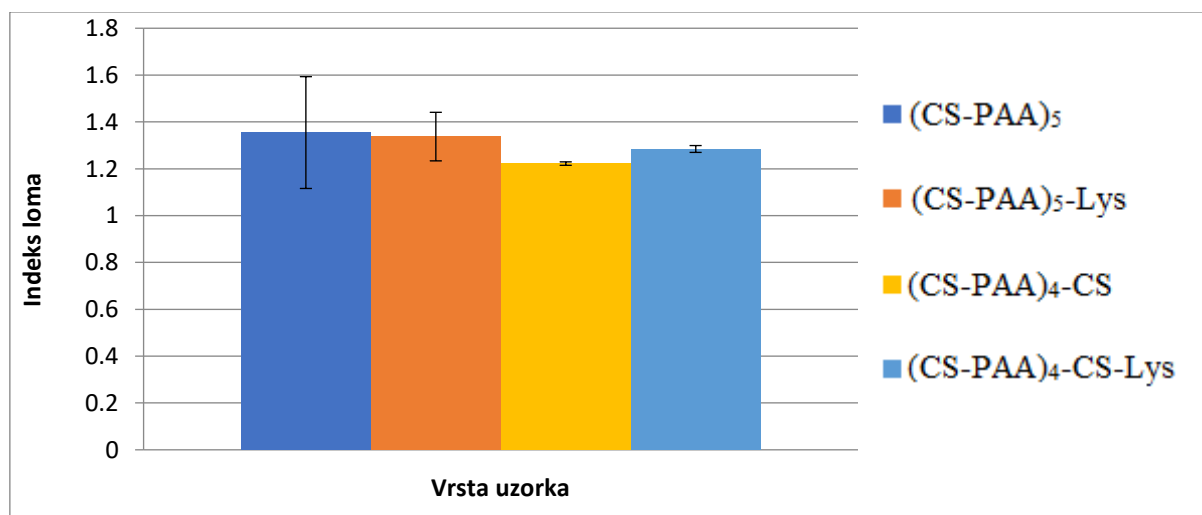
Slika 51. AFM snimka zareza na PEM-u s lizozimom adsorbiranim na 10. sloj PAA ((CS-PAA)₅-Lys).
((CS ($\gamma = 4 \text{ g/L}$), PAA ($\gamma = 4 \text{ g/L}$), Lys ($\gamma = 4 \text{ g/L}$), $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH = 3,0).

4.3. Indeksi loma polielektrolitnih višeslojeva

Osim za određivanje debljine, elipsometrijska mjerenja su korištena kako bi se odredila optička svojstva PEM-ova, tj. njihovi indeksi loma. Dobiveni rezultati su prikazani na slici 52. Indeksi loma su nakon svakog sloja pokazivali gotovo linearan pad te su konvergirali prema očekivanoj vrijednosti $n = 1,46$.⁵⁶ Indeksi loma svih četiri višesloja su slični što je za očekivati (slika 53.).



Slika 52. Elipsometrijski određena ovisnost indeksa loma o broju adsorbiranih slojeva polielektrolita na površinu supstrata



Slika 53. Elipsometrijski određeni indeksi loma dobiveni pomoću iterativne metode za različite polielektrolitne višeslojeve

4.4. Hrapavost površine

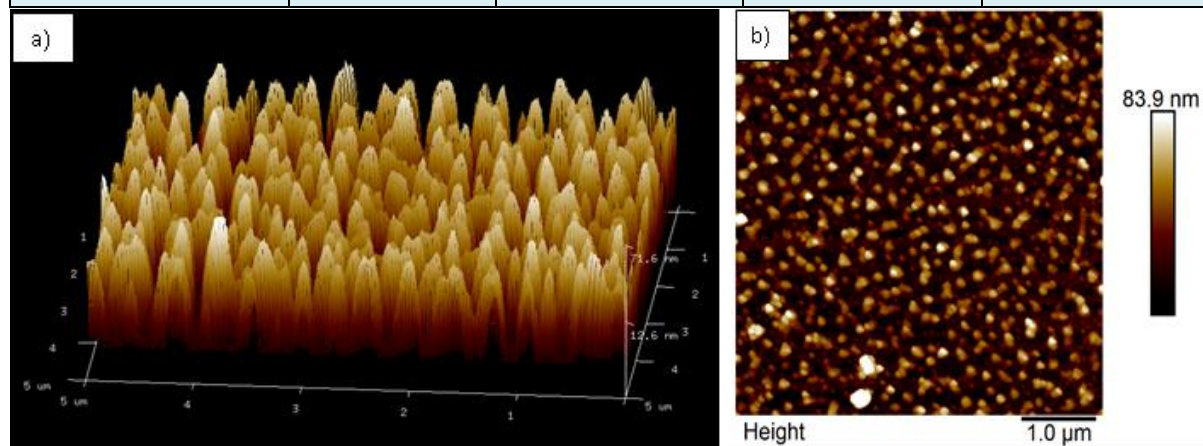
4.4.1. Određivanje hrapavosti površine mikroskopom atomskih sila

Tijekom proučavanja hrapavosti na AFM snimkama dobiveni su R_q i R_a faktori, kao i Wenzelov koeficijent (r) koji nam omogućuje da razlikujemo hrapavu od glatke površine, a označava omjer površine i njene projicirane površine. Hrapavost uzorka povezana je s kontaktnim kutom položene kapi što utječe na hidrofobnost/hidrofilnost uzorka i bakterijsku adheziju na površinu uzorka. R_a , R_q i r (Wenzelov koeficijent) su različiti tipovi opisa površinske hrapavosti, a R_a i R_q su već i ranije opisani.

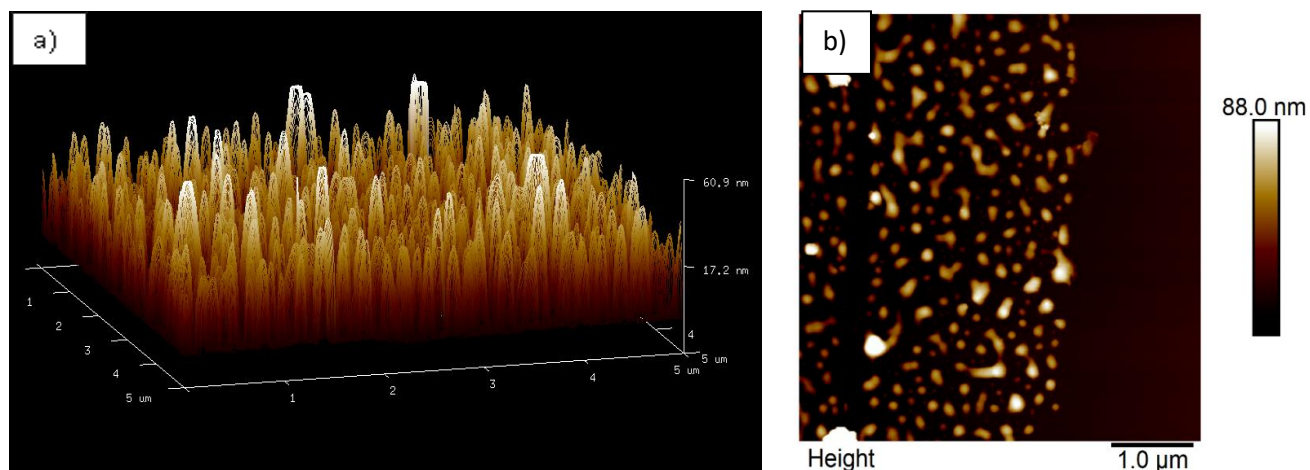
Površinska prekrivenost određena je u NanoScope Analysis programu pomoću „bearing“ analize na dubini od 0 nm. R_a , R_q i r vrijednosti naših uzoraka pokazuju da je površina glatka za sve PEM-ove (Tablica 3.), ali površinska prekrivenost (Q) govori nam da uzorci nisu prekrili supstrat što znači da se film nije formirao već da je nastala skupina „otoka“. Gusta skupina otoka je također dobar način da se uzorak zaštititi od bakterijske adhezije, ali kako se površinska prekrivenost povećava s brojem slojeva, možemo zaključiti da bi s dovoljnim brojem slojeva nastao kompaktan film na površini supstrata.

Tablica 3. Parametri hrapavosti i površinska prekrivenost višeslojeva određena mikroskopom atomskih sila

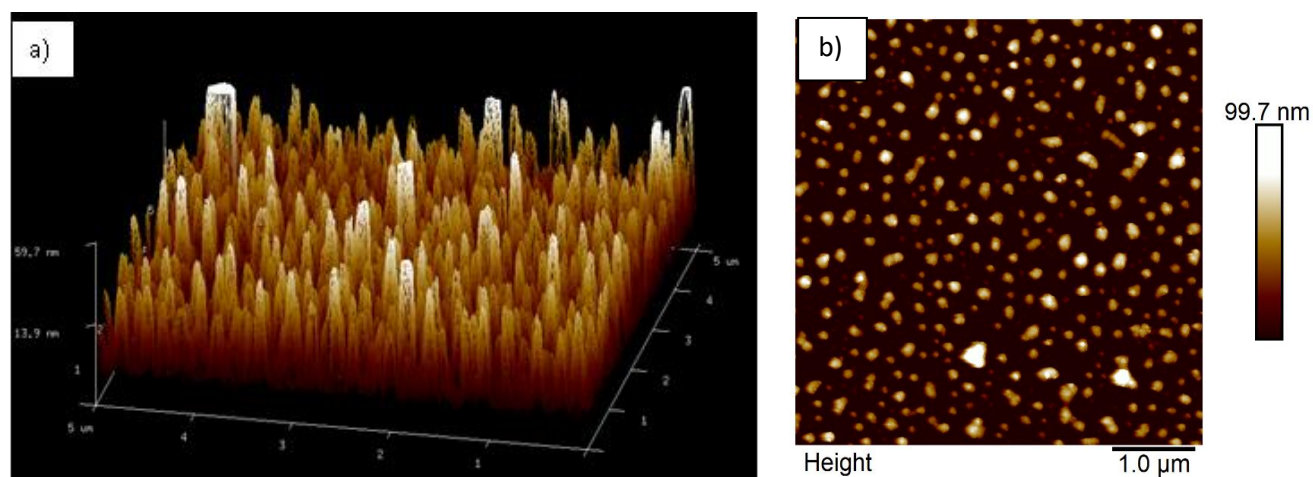
Uzorak	R_q /nm	R_a /nm	Q /%	r
(CS-PAA) ₄ -CS	15,70±0,14	12,74±0,19	36,224±0,761	1,171±0,007
(CS-PAA) ₄ -CS-Lys	21,72±0,21	16,86±0,22	31,152±0,124	1,255±0,005
(CS-PAA) ₅	16,98±0,38	13,62±0,35	37,409±0,959	1,147±0,002
(CS-PAA) ₅ -Lys	26,56±0,27	24,22±0,55	45,291±0,206	1,163±0,002



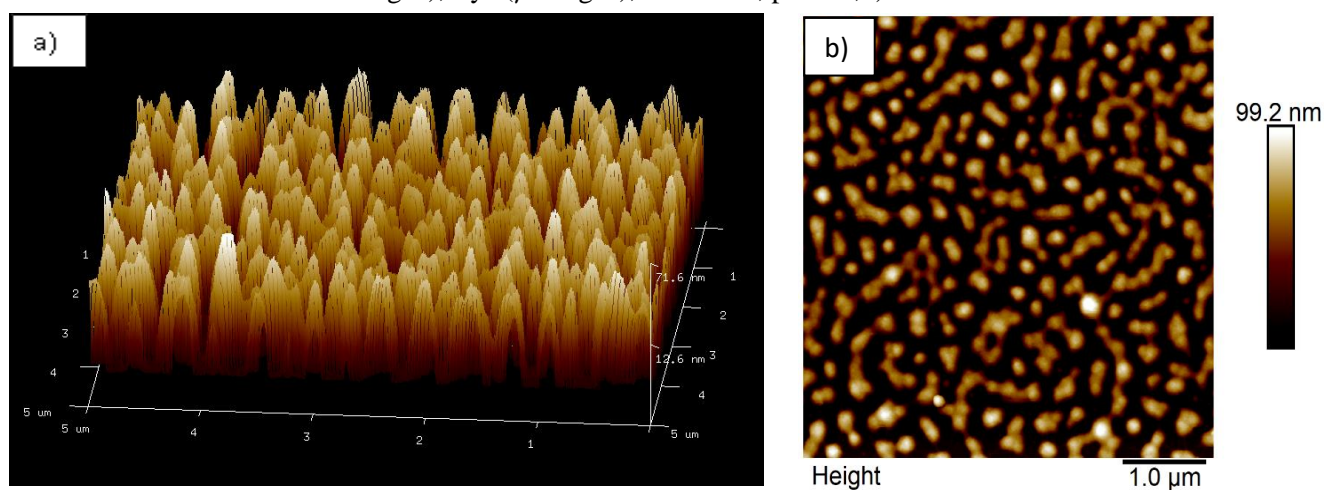
Slika 54. a) 3D i b) 2D AFM snimka površine (CS-PAA)₄-CS višesloja (CS ($\gamma = 4$ g/L), PAA ($\gamma = 4$ g/L), Lys ($\gamma = 4$ g/L), $\theta = 25$ °C, pH = 3,0)



Slika 55. a) 3D i b) 2D AFM snimka površine (na zarezu) (CS-PAA)₅ višesloja (CS ($\gamma = 4$ g/L), PAA ($\gamma = 4$ g/L), Lys ($\gamma = 4$ g/L), $\theta = 25$ °C, pH = 3,0)



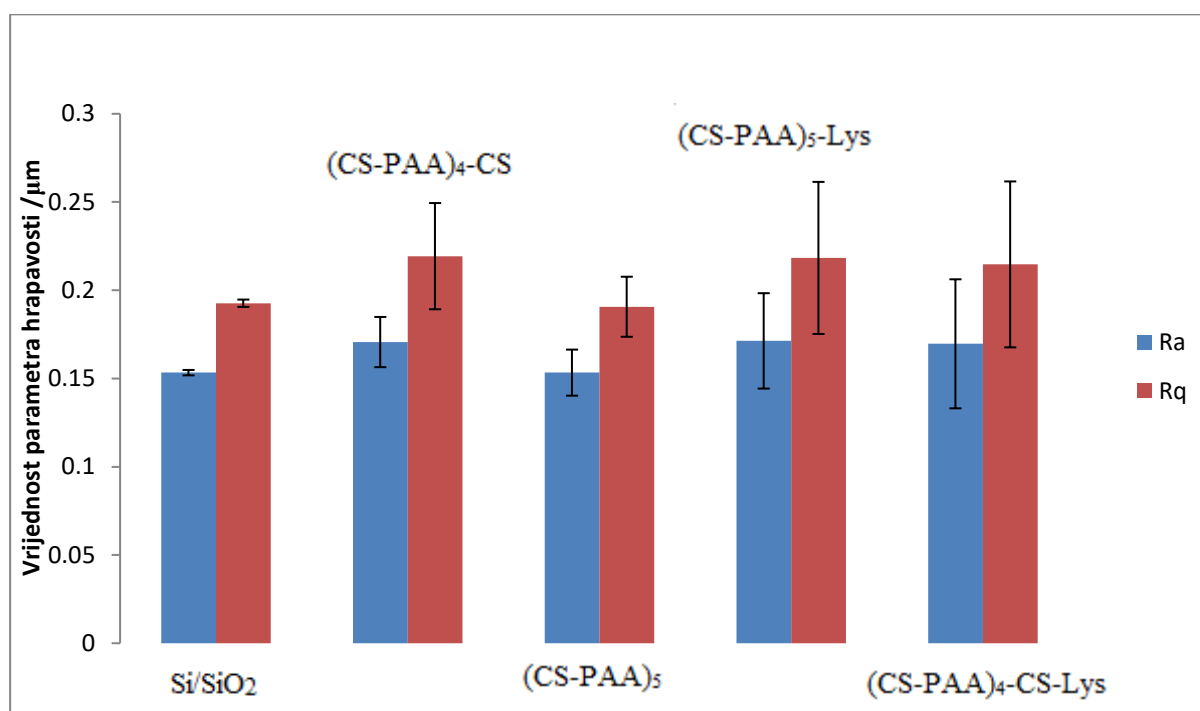
Slika 56. a) 3D i b) 2D AFM snimka površine (CS-PAA)₄-CS-Lys višesloja (CS ($\gamma = 4$ g/L), PAA ($\gamma = 4$ g/L), Lys ($\gamma = 4$ g/L), $\theta = 25$ °C, pH = 3,0)



Slika 57. a) 3D i b) 2D AFM snimka površine višesloja (CS-PAA)₅-Lys (CS ($\gamma = 4$ g/L), PAA ($\gamma = 4$ g/L), Lys ($\gamma = 4$ g/L), $\theta = 25$ °C, pH = 3,0)

4.4.2. Profilometrija

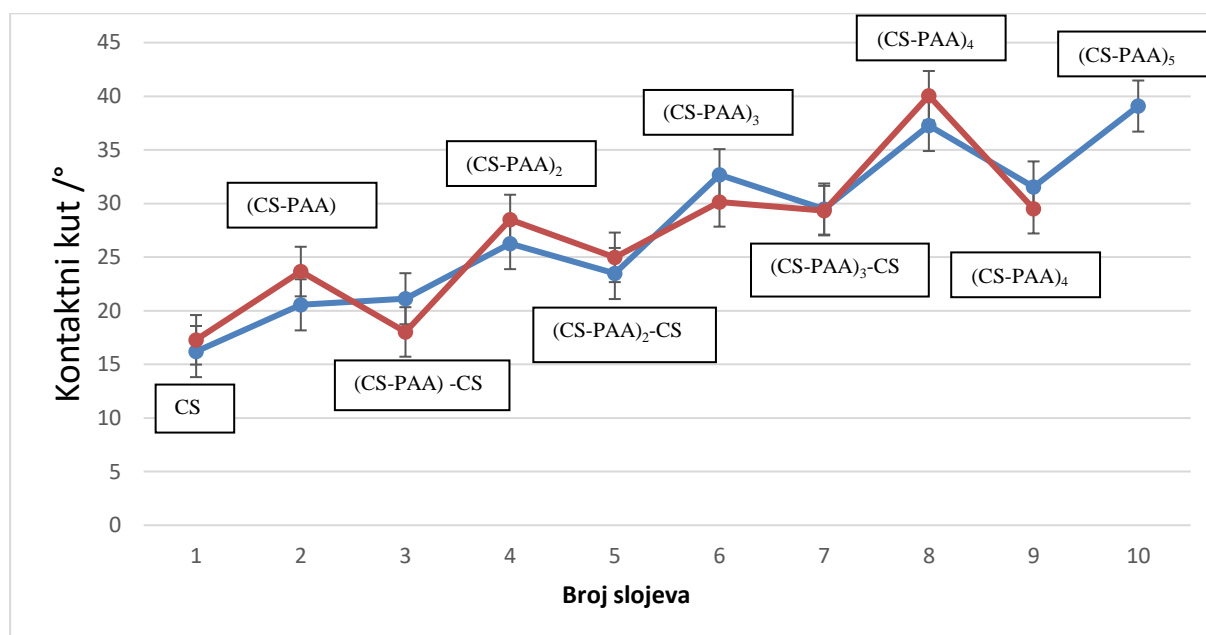
Hrapavost pripremljenih polielektrolitnih višeslojeva je proučena i uz pomoć profilometra te su dobiveni koeficijenti R_a i R_q prema jednadžbama (9) i (10). Oba koeficijenta oko 10 puta su veća od onih dobivenih pomoću AFM-a. To je očekivano jer profilometar mjeri hrapavost po većoj površini u odnosu na AFM. Profilometar mjeri globalnu hrapavost, dok AFM mjeri lokalnu hrapavost. Dodatno, u programu *nanoscope analysis 2.0* (za analizu AFM snimki) elegantno se mogu ukloniti artefakti te otoci koji pripadaju nečistoćama. Te nečistoće mogu se vrlo lako već i pri malom povećanju uočiti na slici 50. Iako je riječ o razlici u cijelom redu veličina, rezultati i dalje potvrđuju kako se radi o glatkim filmovima što prema bi prema literaturi trebalo biti dobro antiadhezijsko svojstvo.



Slika 58. Parametri hrapavosti polielektrolitnih višeslojeva određeni profilometrom.

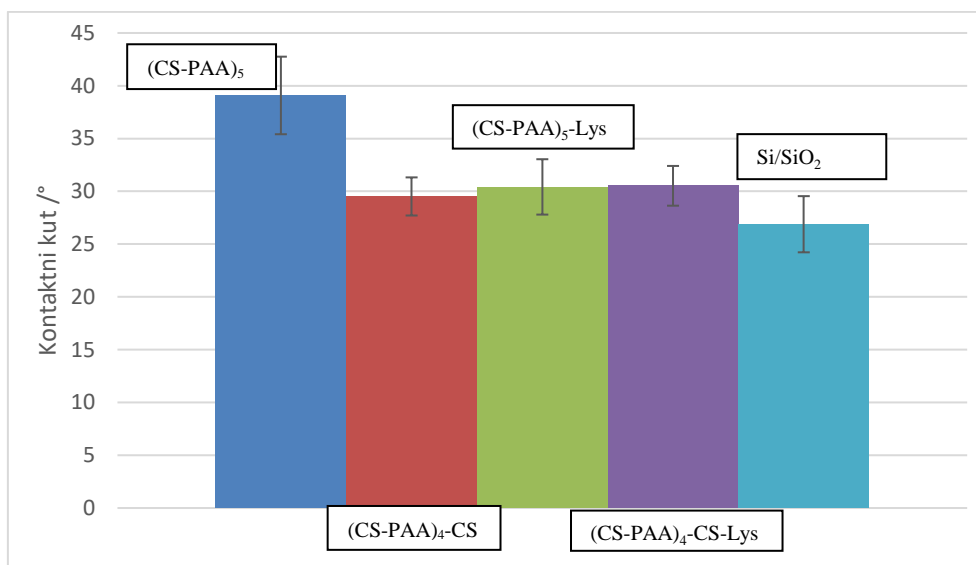
4.5. Kontaktni kut

Kontaktni kut PEM-ova određen je nakon adsorpcije svakog sloja polielektrolita korištenjem tenziometra, a rezultati su prikazani na slici 59. Metoda koja je korištena bila je metoda položene kapi, a slika 61. pokazuje položene kapi na 4 različita uzorka. Slika 59. pokazuje rezultate dva nezavisna mjerenja koji se poklapaju. Kontaktni kut se mjenja u zig-zag trendu tako da je kontaktni kut višesloja manji kada je CS zadnji sloj, a veći kada je PAA terminalni sloj. Ovakvi rezultati su očekivani s obzirom na to da je CS više hidrofilan polielektrolit nego PAA.

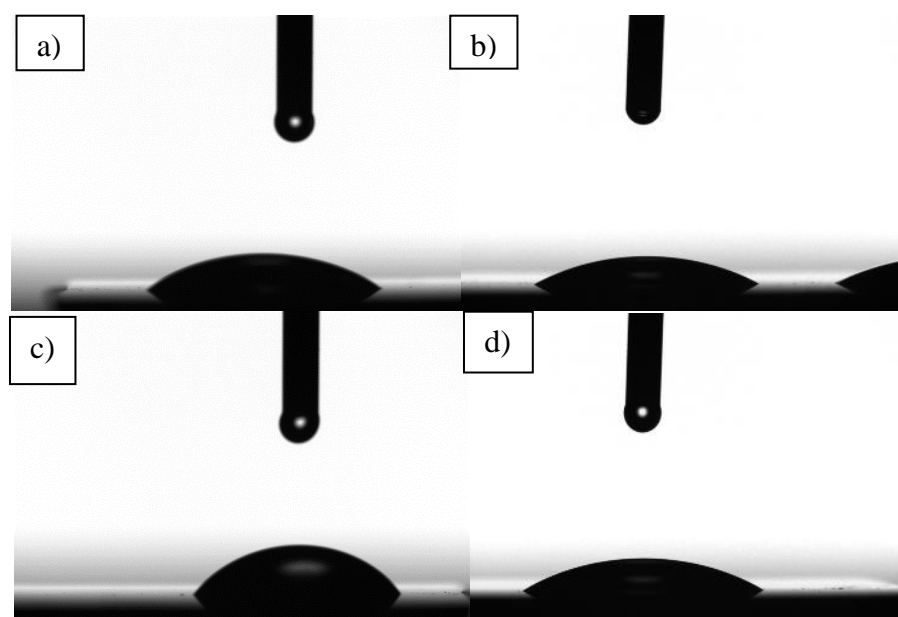


Slika 59. Rezultati dobiveni tenziometrijskim mjerenjima za 2 neovisna uzorka. Mjerenja su provedena za svaki dodani sloj.

Slika 60. prikazuje kontaktne kuteve PEM-ova, PEM-ova s adsorbiranim lizozimom i supstrata. Kontaktni kut supstrata iznosi $26,88^\circ$ što je blisko literaturnim vrijednostima (21°).⁵⁷ Rezultati daju još jedan dokaz da se adsorpcija lizozima događa i na CS i na PAA terminirajućim slojevima, prema čemu se može zaključiti da postoji više različitih vrsta interakcija između polielektrolita i polipeptida. Hidrofilnost utječe na adheziju bakterija, prema literaturi ukoliko se ne radi o superhidrofobnim površinama pravilo je da što je hidrofilnija površina to će adhezija bakterija na površinu biti slabija. Očekivano je da će adhezija bakterija na PEM-ove sa završnim CS i Lys slojevima biti slabija jer su hidrofilniji.



Slika 60. Rezultati dobiveni tenziometrijskim mjerenjima za 2 neovisna uzorka. Mjerenja su provedena za svaki dodani sloj.

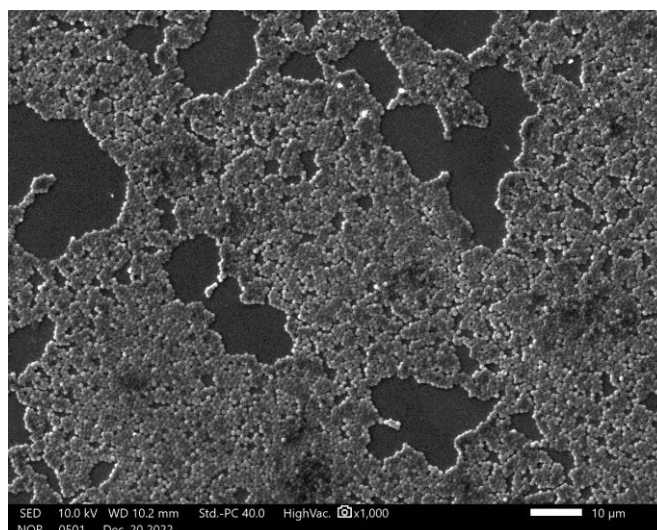


Slika 61. Snimke vodene kapi na površini: a) (CS-PAA)₄-CS, b) (CS-PAA)₄-CS-Lys, c) (CS-PAA)₅, d) (CS-PAA)₅-Lys višesloja

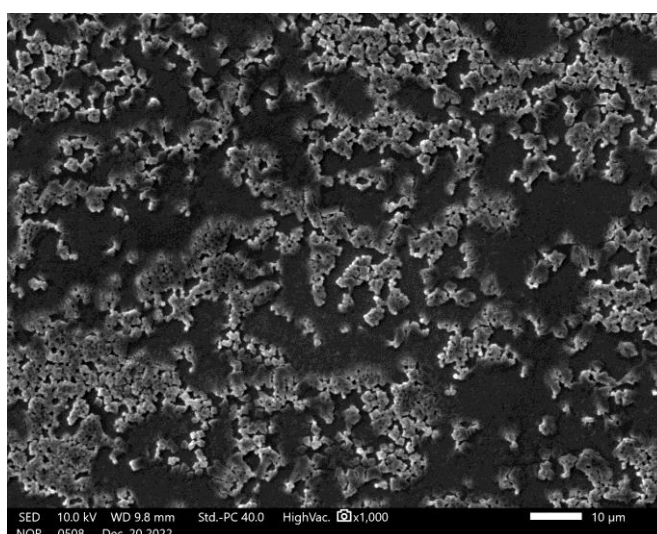
4.6. Adhezija bakterija

U ovom diplomskom radu analizirana je adhezija bakterija uz pomoć pretražnog elektronskog mikroskopa. Uzorci koji su snimani bili su pripremljeni od CS/PAA filma s adheriranim lizozimom na terminalni sloj. Pretražnim elektronskim mikroskopom snimljeni su uzorci te su njihova površinska svojstva dovedena u korelaciju s adhezijom bakterija. Istražen je utjecaj adsorbiranog proteina, hrapavosti, površinskog naboja i hidrofilnosti na adheziju dvije vrste bakterija - *P. aeruginosa* (ATCC 27853) i *S. aureus* (ATCC 25923).

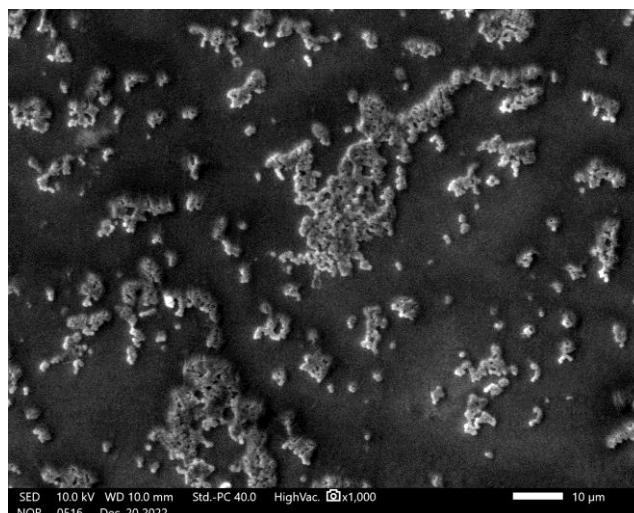
SEM snimke za 3 vrste PEM-ova za eksperiment adhezije *S. aureus* (ATCC 25923) prikazane su na slikama 62., 63. i 64.



Slika 62. SEM snimka bakterija *S. aureus* (ATCC 25923) adheriranih na (CS-PAA)₅ višesloj



Slika 63. SEM snimka bakterija *S. aureus* (ATCC 25923) adheriranih na (CS-PAA)₄-CS višesloj



Slika 64. SEM snimka bakterija *S. aureus* (ATCC 25923) adheriranih na (CS-PAA)₄-CS-Lys višesloj

Na slici 62. vidimo SEM snimku adheriranih *S. aureus* (ATCC 25923) bakterija na (CS-PAA)₅ višesloju, na kojem je jasno vidljiv nastanak biofilma. Na slici 63. prikazana je SEM snimka adheriranih *S. aureus* (ATCC 25923) bakterija na (CS-PAA)₄-CS višesloju sa slabije izraženom adhezijom bakterija. Na slici 64. prikazana je SEM snimka adheriranih *S. aureus* (ATCC 25923) bakterija na (CS-PAA)₄-CS-Lys sustavu u kojem je došlo do značajno manje adhezije bez nastanka biofilma. Ovakva progresija adhezije bakterija u skladu je s eksperimentalnim podacima dobivenim u mjerenjima elektrokinetičkog potencijala i hidrofилности.

4.7. Utjecaj površinskih svojstava na adheziju bakterija

Nizom eksperimenata okarakterizirali smo pripremljene polielektrolitne višeslojeve. Prva mjerenja bila su usredotočena na određivanje izoelektrične točke nanočestica SiO₂ kako bi znali pri kojim uvjetima raditi adsorpciju polielektrolita. Mjerenja elektroforetske pokretljivosti dokazala su da se adsorpcija polielektrolitnih višeslojeva na nanočestice SiO₂ događa. Alternacija potencijala koja se događa nakon svakog adsorbiranog sloja pokazuje da nakon svakog tretmana nanočestice s polielektrolitom dolazi do adsorpcije. Snažne promjene vidljive su između dva sloja suprotno nabijenih polielektrolita i između uzastopno adsorbiranih poli(akrilne kiseline) i lizozima. Suptilnije promjene, ali značajne vidljive su nakon tretmana polikationa s lizozimom. Snažna promjena između dva različito nabijena polielektrolita može se objasniti jakim elektrostatskim vezanjem, ali s obzirom na to da se predznak ne mijenja možemo zaključiti da dolazi tek do djelomične kompenzacije naboja pri pH = 3 zbog relativno visoke koncentracije H⁺ iona i visokog stupnja protonacije polielektrolita. Suptilna promjena

uočena kod adsorpcije lizozima na terminalni sloj CS, može se objasniti da vodikove interakcije potpomažu vezanje lizozima na površinu kitozana. Iako je kitozan poznati supstrat lizozima, te sadrži β -(1 \rightarrow 4) glikozidnu vezu koju lizozim cijepa, način izgradnje PEM-ova uzrokuje vezanje i imobilizaciju kitozana što sprječava njegov ulazak i povoljnu interakciju s aktivnim mjestom lizozima. Ovim eksperimentima potvrđeno je da se adsorpcija polielektrolita događa te da nastaje polielektrolitni višesloj. Elipsometrijskim mjerenjima potvrđen je rast PEM-a koji je i ranije opisan literaturno, a sadrži karakteristike i linearnog i eksponencijalnog rasta (slike 46. i 47.). Eksponencijalan rast očekivan je za slabe polielektrolite što i PAA i CS jesu, međutim pri niskim pH-vrijednosti izgradnje, čak i kod slabih polielektrolita on konvergira u linearan. Različita svojstva pripremljenih polielektrolitnih filmova prikazana su u Tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti površinskih svojstava mjerenih raznim instrumentima za istraživane višeslojeve

Uzorak	R_a (AFM)/nm	R_q (AFM)/nm	R_a (Profilo)/nm	R_q (Profilo)/nm	Kontaktni kut /°	Q /%	d (AFM)/nm	d (elipso)/nm	d (elipso)it/nm	n	zeta/mV
(CS-PAA) ₄ -CS	12,74±0,19	15,7±0,14	153,3±14,2	219,3±30,1	29,52±1,81	36,22±0,76	15,6	14,91±0,74	20,01±0,81	1,22±0,01	-33,86 (pH=6,88)
(CS-PAA) ₄ -CS-Lys	16,86±0,22	21,72±0,21	169,7±36,6	214,7±47,0	30,52±2,62	31,15±0,12	22,1	21,86±1,65	30,38±1,01	1,28±0,01	-16,01 (pH=6,78)
(CS-PAA) ₅	13,62±0,35	16,980±0,38	153,3±13,1	190,7±17,0	39,08±3,67	37,41±0,96	10,7	22,04±0,6	32,03±2,22	1,35±0,24	-2,64 (pH=6,85)
(CS-PAA) ₅ -Lys	24,22±0,55	26,560±0,27	171,3±27,0	218,3±43,1	30,42±1,88	45,29±0,21	23,5	30,93±0,60	41,08±1,84	1,34±0,10	-51,75 (pH=6,87)

Debljina konačnih filmova, također je okarakterizirana elipsometrijski uz pomoć iterativne i neiterativne metode. Vrijednosti debljine navedene su u Tablici 4., a intuitivan zaključak koji proizlazi iz njih je taj da debljina raste s povećanjem broja slojeva. Rast koji se događa nakon adsorpcije lizozima na CS i onaj koji se događa nakon adsorpcije lizozima na PAA otprilike je jednak što nam potvrđuje da se značajne količine lizozima adsorbiraju na površinu CS i PAA, bilo elektrostatski bilo vodikovim interakcijama. Analizom zarezâ uz pomoć mikroskopije atomskih sila potvrđeni su rezultati vezani uz debljinu PEM-ova osim u slučaju (CS-PAA)₅ čija je mjerena vrijednost bila manja od one dobivene uz pomoć elipsometra. Snimke mikroskopa atomskih sila potvrdile su da nam ne nastaje kompaktni film, već da je uzorak prekriven otocima PEM-ova. Analizom AFM snimke određena je prekrivenost pojedinim PEM-om, te je vidljivo kako je prekrivenost najveća za uzorak (CS-PAA)₅-Lys koji ima i najviše slojeva, a slijedio je uzorak (CS-PAA)₅. Uzorci (CS-PAA)₄-CS i (CS-PAA)₅ imali su vrlo malu razliku u prekrivenosti, dok je (CS-PAA)₄-CS-Lys imao najmanju što iznenađuje jer ima više slojeva od

uzorka (CS-PAA)₄-CS. Tenziometrijski rezultati pokazali su „cik-cak“ trend nakon svakog adsorbiranog sloja, što je još jedan dokaz da dolazi do adsorpcije svakog od slojeva. Kontaktni kut supstrata iznosio je oko 30° što je u skladu s literaturnim podacima. Alternacija između manjeg i većeg kontaktnog kuta između svakog adsorbiranog sloja je očekivana s obzirom na to da je PAA manje hidrofilan od CS. Smanjenje kontaktnog kuta nakon tretmana lizozimom također je dokaz adsorpcije zbog njegove hidrofilne prirode. Za svaki sloj CS i za svaki sloj PAA kontaktni kut PEM-a je porasao što je vidljivo na slikama 59. i 60. Ovakvo ponašanje moguće je zbog difuzije PAA na površinu PEM-a na kojem je terminalni sloj CS što dovodi do hidrofobnijeg karaktera CS od očekivanog. Povećanje kontaktnog kuta gdje je PAA terminalni sloj može se dovesti u vezu s povećanom površinskom prekrivenosti nakon svakog adsorbiranog sloja, naime povećana prekrivenost supstrata kitozonom omogućuje i više veznih mjesta za PAA, na taj način udio PAA u PEM-u raste zajedno s prekrivenošću, a polegnuta kap ima veću kontaktnu površinu sa PEM-om a manju sa supstratom što joj povećava kontaktni kut. Hrapavost je mjerena pomoću AFM-a i profilometra, te je ustanovljeno da su uzorci glatki, a dvije različite metode različite podatke vezane uz lokalnu i globalnu hrapavost PEM-ova. Korišteni supstrat bila je Si/SiO₂ pločica koja je jedan od najgladnih materijala na svijetu, a značajne promjene u hrapavosti nisu primijećene nakon što je na njih postavljen polielektrolitni višesloj. Relativno očuvana glatkoća govori nam da kod naših PEM-ova nema značajnih izbočina te da prate konture Si/SiO₂ supstrata. Slični rezultati kod svih PEM-ova govore nam da hrapavost kod naših PEM-ova neće biti presudna za adhezijski eksperiment. Mjeren je također i zeta potencijal ravnih površina nakon pripreme PEM-ova na pločici silicija. Pri niskom pH-u svaki od pripremljenih PEM-ova imao je pozitivan potencijal, kao što je to bilo vidljivo i kod mjerenja elektroforetskog raspršenja nanočestica. Zbog eksperimenta bakterijske adhezije, najzanimljiviji su nam potencijali koji se javljaju pri pH = 7 - 7,4, a oni su za sve PEM-ove bili negativni. Sva navedena mjerenja utječu na bakterijsku adheziju koja je praćena pretražnim elektronskim mikroskopom. Dobivene su tri jasne snimke koje prate adheziju *S. aureus* na tri različita PEM-a (slike 62., 63. i 64.). Adhezija koja je najbolje primijećena bila je na (CS-PAA)₅ gdje je jasno vidljivo da je došlo do nastanka biofilma. Adhezija je bila smanjena za (CS-PAA)₄-CS te najmanja za (CS-PAA)₄-CS-Lys. Literaturno je opisano kako će hidrofilnije površine biti manje pogodne za adheziju bakterija osim ako se ne radi o superhidrofobnim. Od ta tri PEM-a, najveći kontaktni kut imao je (CS-PAA)₅, zatim (CS-PAA)₄-CS pa (CS-PAA)₄-CS-Lys, takav rezultat u skladu je s adhezijskim eksperimentom.

Površinski naboj također utječe na adheziju bakterija. U literaturi je opisano kako će negativni naboj elektrostatski odbijati bakterije, dok će pozitivan imati antibakterijsko djelovanje.^{25,26} Izmjereni zeta potencijali ravne plohe dobiveni mjerenjima potencijala strujanja dali su nam uvid u antiadhezijsko ponašanje PEM-ova za pH područje koje je blisko onom pri kojem je proveden adhezijski eksperiment. Iz slike 45. i Tablice 4. može se vidjeti da će najmanje nabijen pri tim uvjetima biti PEM (CS-PAA)₅, zatim (CS-PAA)₄-CS-Lys pa (CS-PAA)₄-CS. Ovakav rezultat dodatno potvrđuje da će na PEM-u (CS-PAA)₅ biti pojačana adhezija bakterija zbog slabijeg elektrostatskog odbijanja. Konačno, bitno je i koji polielektrolit terminira naš film. Mnogi izvori opisuju antibakterijska svojstva kitozana i lizozima, dok ih PAA nema. Snimke dobivene pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa to nam i potvrđuju jer je na snimci PEM-a (CS-PAA)₅ (kojeg terminira PAA) prisutno mnogo bakterija koje su stvorile biofilm, PEM (CS-PAA)₄-CS pokazuje smanjenu adheziju dok PEM (CS-PAA)₄-CS-Lys pokazuje značajno manje adheriranih živih bakterija. Za sad je zaključak kako je PEM (CS-PAA)₄-CS-Lys najbolji antiadhezijski/antibakterijski PEM. Što se tiče adhezije bakterije *P. aeruginosa* kod preliminarnih snimanja dolazilo je do poteškoća. Kultura spomenutih bakterija bila je kontaminirana nepoznatim kugličastim bakterijama zbog čega nije moguće jednoznačno odrediti uspješnost adhezije bakterija (vidi slike u Dodatku).

Dobivenim PEM-ovima također je zbog njihove potencijalne buduće primjene kao funkcionalnih premaza voća i povrća okarakterizirano i optičko svojstvo indeksa loma. Indeksi loma sva 4 PEM-a su očekivano slični, a njihove vrijednosti indeksa loma s povećanjem broja slojeva konvergiraju k literaturnim vrijednostima od $n = 1,46$ što nam govori da imaju povoljna optička svojstva s obzirom na primjenu.

§ 5. ZAKLJUČAK

U svrhu ispitivanja antiadhezijskih i antimikrobnih svojstava uspješno su pripremljeni polielektrolitni višeslojevi kitozan/poli(akrilna kiselina)/lizozim uz pomoć sloj po sloj metode.

Mjerenjem elektroforetskog raspršenja nanočestica SiO_2 određena je njihova izoelektrična točka. Mjerenjima elektroforetskog raspršenja SiO_2 nanočestica nakon tretmana s polielektrolitima potvrđeno je kako dolazi do adsorpcije polielektrolita i nastanka polielektrolitnog višesloja. Elipsometrijskim metodama utvrđeno je da pri uvjetima $\text{pH} \approx 3,0$ dolazi do rasta višesloja koji nije ni linearan ni eksponencijalan, već se radi o kombinaciji te dvije vrste rasta.

Debljina polielektrolitnih višeslojeva izmjerena je elipsometrom i procijenjena iz AFM snimke. Obje metode dale su slične rezultate. Evaluacija površinske prekrivenosti odrađena je analizom AFM snimki uz pomoć računalnog programa *Nanoscope Analysis 2.0*, te je uočeno da dolazi do stvaranja otoka nanometarskih dimenzija, a ne kompaktnog filma.

Površinska hrapavost višeslojeva određena je profilometrom i analizom AFM snimke pomoću računalnog programa. Profilometrom je dobivena globalna hrapavost, dok je analizom AFM snimke dobivena lokalna hrapavost. Razlike u redu veličine između hrapavosti dobivene profilometrom i AFM-om mogu se objasniti nečistoćama i artefaktima koje se elegantno mogu izbjeći u analizi AFM snimke. Iako je razlika mjerenih rezultata te dvije metode velika ipak se može zaključiti da se radi o glatkim filmovima.

Tenziometrijom su određeni kontaktni kutovi višeslojeva. Višesloj kojem je završni sloj poli(akrilna kiselina) $((\text{CS-PAA})_5)$ ima najveći kontaktni kut, dok $(\text{CS-PAA})_5\text{-Lys}$, $(\text{CS-PAA})_4\text{-CS-Lys}$, $(\text{CS-PAA})_4\text{-CS}$ imaju slične kontaktne kutove. Rastom višesloja primijećen je i rast kontaktnog kuta neovisno o vrsti zadnjeg polielektrolita što upućuje na to da udio hidrofobnijeg polielektrolita u višesloju utječe na veću hidrofobnost. Takav rezultat također upućuje na zaključak da su naši višeslojevi difuzni, tj. da nemaju jasno definirane slojeve.

Zbog potencijalne primjene određeni su indeksi loma višeslojeva. Vrijednost indeksa loma porastom broja slojeva konvergira u poželjnu vrijednost.

Mjerenjem potencijala strujanja pri različitim pH-vrijednostima dobivene su informacije o površinskom naboju polielektrolitnih višeslojeva. Pri $\text{pH} = 3$, zeta potencijali dobiveni metodom potencijala strujanja u skladu su s mjerenjima elektroforetskog raspršenja

pri istom pH. Pri uvjetima približnim onima koji su vladali tijekom adhezije bakterija (pH = 7,4) zeta potencijali svih uzoraka bili su negativni uz napomenu da je (CS-PAA)₅ bio najbliži elektroneutralnosti. Pretražnim elektronskim mikroskopom snimljeni su uzorci nakon adhezije bakterije *S. aureus* na uzorke s polielektrolitnim višeslojevima. Adhezija bakterija bila je najizraženija kod (CS-PAA)₅, nešto slabija kod (CS-PAA)₄-CS te značajno smanjena kod (CS-PAA)₄-CS-Lys. Prema rezultatima adhezijskog eksperimenta zaključeno je da hidrofilnost i površinski naboj značajno povećavaju antiadhezijska svojstva višeslojeva, dok prisutnost lizozima inhibira bakterijski rast na površini.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFM – Mikroskop atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscope*)

Asp-52 – Aminokiselina aspartat na poziciji 52 u nizu primarne strukture proteina

ATCC – Američka kolekcija kultura

BHI – Hranjiva otopina za bakterijski rast (engl. *Brain-Heart Infusion*)

BSE - Povratno raspršeni elektroni (engl. *backscattered electrons*)

CFU – Jedinica za formiranje kolonije (engl. *Colony forming unit*)

CS – Kitozan (engl. *Chitosan*)

EBSD – Difrakcija povratno raspršenih elektrona (engl. *Electron backscatter diffraction*)

EDS – Energijski raspršujuća rendgenska spektroskopija (engl. *energy dispersive x-ray spectroscopy*)

ELS – Elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. *Electrophoretic light scattering*)

Glu-35 – Aminokiselina glutamat na poziciji 35 u nizu primarne strukture proteina

HA/PLL – Sustav hijaluronska kiselina/poli(L-lizin)

IEP – Izoelektrična točka (engl. *Isoelectric point*)

Lys - Lizozim

NA – Hranjivi agar (engl. *Nutrient agar*)

NAM – N-acetilmuraminska kiselina

NAG – N-acetilglukozamin

PAA – poli(akrilna kiselina) (engl. *Poly(acrylic acid)*)

PBS – Fosfatni pufer (engl. *Phosphate buffer solution*)

RMS – Srednja kvadratična vrijednost (engl. *Root mean square*)

SED – Detektor sekundarnih elektrona (engl. *Secondary electron detector*)

SEI – Oslikavanje pretražnom elektronskim mikroskopom (engl. *Scanning electron imaging*)

SEM – Pretražni elektronski mikroskop (engl. *Scanning electron microscope*)

STM – Pretražni tunelirajući mikroskop (engl. *Scanning tunneling microscope*)

§ 7. LITERATURA

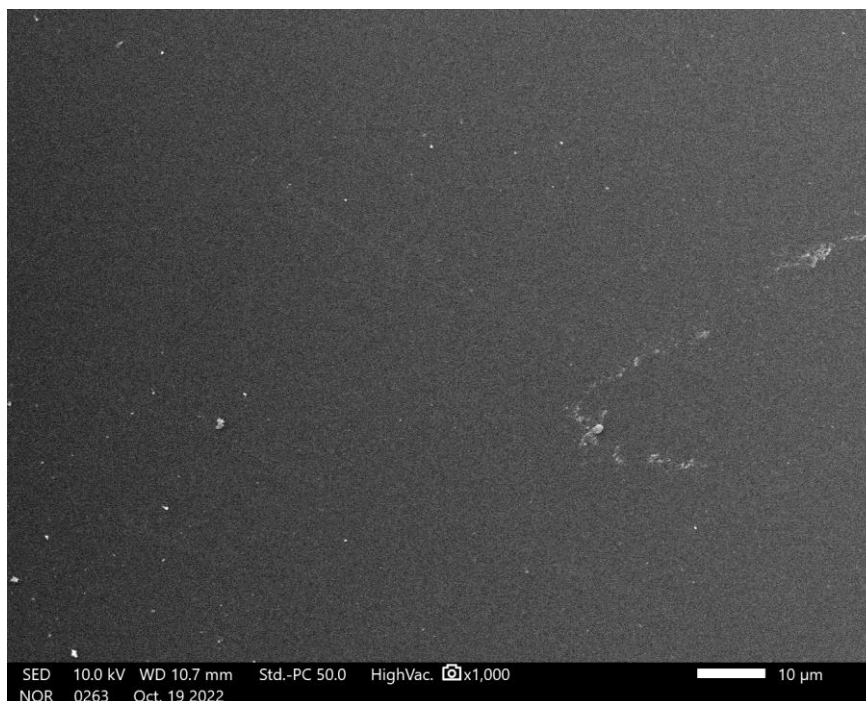
1. <https://www.britannica.com/biography/Alexander-Fleming> (datum pristupa 5.2.2023.)
2. <https://pdb101.rcsb.org/motm/9> (datum pristupa 5.2.2023.)
3. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (datum pristupa 5.2.2023.)
4. S. Zhang, M. Xing, B. Li, *Int. J. Mol. Sci.* **19**(6) (2018), 1641.
5. D.Kovačević, K. Godič Torkar, J. Jukić, G. Dražić, A. Abram, K. Bohinc, *Polymers* **8** (2016) 345.
6. S. Zheng, M. Bawazir, A. Dhall, H. Kim, J. Heo., G. Hwang, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9** (2021) 643722
7. F. Song, H. Koo, D. Ren, *J. Dent. Res.*, **94**(8) (2015) 1027–1034.
8. G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **210/211** (1992) 831–835.
9. P. Bieker, M. Schönhoff, *Macromolecules*, **43**(11) (2010) 5052–5059.
10. N. Velk, K. Uhlig, A. Vikulina, C. Duschl, D. Volodkin, *Colloids Surf., B*, **147** (2016) 345-350.
11. M. A. Cohen Stuart, R. De Vries i H. Lyklema, H. Lyklema, *Fundam. Interface Colloid Sci.*, Vol. 5, Elsevier, Amsterdam, 2005.
12. V. S. Meka, M.K.G. Sing, M. R. Pichika, S. R. Nali, V. R. M. Kolapalli, P. Kesharwani, *Drug Discovery Today*, **22** (2017) 1697-1706.
13. A. Sundaramurthy, *Stimuli Responsive Polym. Nanocarriers for Drug Delivery Appl.*, **1** (2018) 247-266.
14. J. Salopek, *Interakcije suprotno nabijenih polielektrolita u otopini i na površini*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 5-6.
15. F. Carnal, S. Stoll, *J. chem. phys.*, **134** (2011) 044909
16. H. Madhav, N. Singh, G. Jaiswar, *Materials for Biomedical Engineering*, (2019) 105-143., Elsevier
17. W. Li, W. Chen, Z. Wang, W. Chen, M. Zhang, Q. Zhong, J. Pein, H. Chen, *Foods*, **11** (2022) 1394.
18. A. Car, P. Baumann, J. T. Duskey, M. Chami, N. Bruns, W. Meier, *Biomacromolecules*, **15**(9) (2014), 3235–3245.

19. H. Yilmaz Atay, *Functional Chitosan*, Springer, Singapore str. 457-489.
20. B. Teixeira-Costa, C. Andrade, *Biomolecules*, **11**(2021) 1599
21. T.Szatkowski, A.Kolodziejczak-Radzimska, J. Zdarta, K. Szwarc-Rzepka, D.Paukszta, M. Wysokowski, H. Ehrlich, T. Jesionowski, *Physicochem. Probl. of Miner. Process.*, **51**(2015) 575-585
22. N. Mohamad, E.Y.X Loh, M.B. Fauzi, M. H. Ng, M. C. I. M. Amin, *Drug Delivery Transl. Res.*, **9** (2019) 444-452.
23. <https://nl.wikipedia.org/wiki/Polyacrylzuur> (Datum pristupa 5.2.)
24. [Schematic-representation-of-a-polyacrylic-acid-synthesis-and-b-polysodium-acrylate.png \(850×375\) \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/350837585/Schematic-representation-of-a-polyacrylic-acid-synthesis-and-b-polysodium-acrylate-png) (Datum pristupa 5.2.)
25. L. Séon, P. Lavallo, P. Schaaf, F. Boulmedais, *Langmuir*, **31**(47) (2015) 12856-12872.
26. K. Bohinc, J. Bajuk, J. Jukić, A. Abram, M. Oder, K. Godič Torkar, P. Raspor, D. Kovačević, *Int. J. Adhes. Adhes.*, **103** (2020) 102687.
27. G Hardin, J., Bertoni, GP., L. Kleinsmith, *Becker's World of the Cell, 9th Global Edition*, Pearson, Boston, str. 142-146., 2019.
28. H. Morrison, *Enzyme active sites and their Reaction Mechanisms*, Academic Press, Cambridge (MA), USA str. 121-127., 2021.
29. https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Mecanism_of_action_for_Lysozyme.svg (Datum pristupa 5.2.2023.)
30. <https://proteopedia.org/wiki/index.php/Lysozyme> (Datum pristupa 5.2.2023.)
31. N. Khorshidian, E. Khanniri, M. Reza Koushki, S. Sohrabvandi, M. Yousefi, *Front. nutr.*, **9** (2022)
32. N. Kallay, *Koloidna i međupovršinska kemija, skripta za internu uporabu*, Zavod za fizikalnu kemiju, kemijski odsjek PMF-a, Zagreb, 2007, str. 1-42
33. <https://wiki.anton-paar.com/hr-hr/zeta-potencijal/> (Datum pristupa 5.2.2023.)
34. N. Hilal, A. Fauzi Ismail, T. Matsuura, D. Oatley-Radcliffe, *Membr. Charact.*, Elsevier, 2017
35. A. Barišić, *Termodinamika procesa na međupovršini inertna tvar/vodena otopina elektrolita*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 34-35.
36. C. Cobet, u K. Hinrichs, K.-J. Eichhorn (ur.), *Ellipsometry of Functional Organic Surfaces and Films*, Springer International Publishing, Cham, 2018, 1–27.

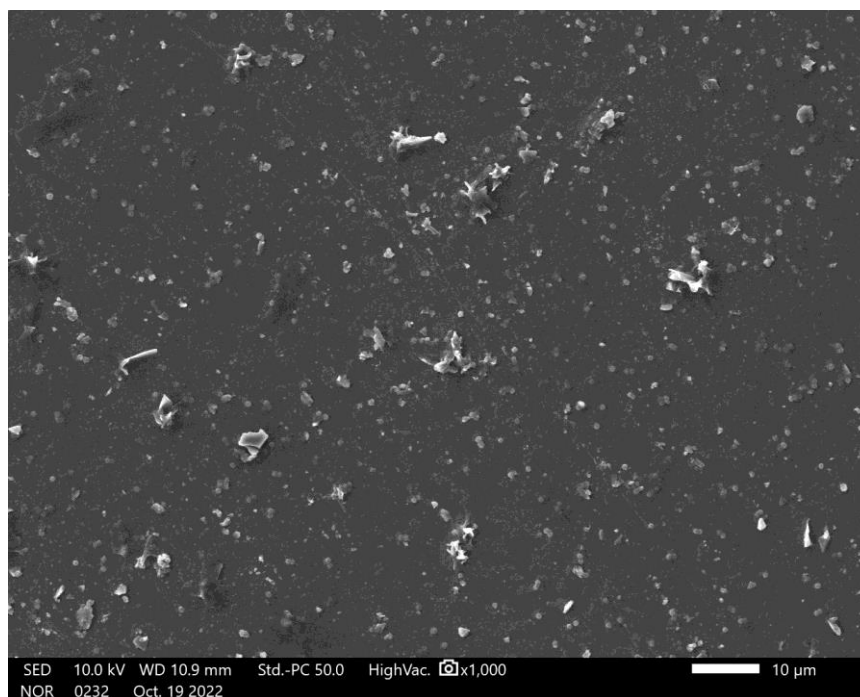
37. Y. Gupta, P. Arun, *Int. J. Phys.* 3 (2014) 8–11.
38. <https://www.jawoollam.com/resources/ellipsometry-tutorial/polarized-light> (datum pristupa 7.2.2023.)
39. <https://www.nanoscience.com/techniques/optical-profilometry/#:~:text=Profilometry%20is%20a%20technique%20used,probe%20or%20by%20using%20light>. (datum pristupa, 5.2.2023.)
40. Haus, J. W. *Nanocharacterization. Fundamentals and Applications of Nanophotonics*, Woodhead Publishing, 2016, 185–210
41. R. R. L. De Oliveira, D. A. C. Albuquerque, T. G. S. Cruz, F. M. Yamaji, F. L. Leite, u V. Bellitto (ur.), *Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale*, InTech, 2012, str. 157.
42. https://elemstroj.fsb.hr/pdf/design/2007/hrapavost_tehnickih_povrsina.pdf (datum pristupa, 5.2.2023.)
43. B. Nölting, *Methods in Modern Biophysics, 2nd ed.*, Springer, 2006, 121–133.
44. G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930–933.
45. (preuzeto i prilagođeno iz <https://pharm.virginia.edu/facilities/atomic-force-microscope-afm/>, datum pristupa 5.2.2023.)
46. P. J. Eaton, P. West, *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press, Oxford ; New York, 2010, 9-120.
47. <https://www.nanoscience.com/techniques/tensiometry/> (Datum pristupa 5.2.2023.)
48. I. Gao, T.J. McCarthy, *Langmuir*, **22** (2006) 6234.
49. <https://www.bioline.com/attension/optical-tensiometers/theta-flow> (Datum pristupa, 5.2.2023.)
50. R. F. Egerton, *The Scanning Electron Microscope u Physical Principles of Electron Microscopy*, Springer, Switzerland, 2016, str. 121–147.
51. M. Siek, *Electrochemical preparation of Ag- and Au-based plasmonic platforms*, PhD Thesis, Institute for Basic Science, Ulsan
52. https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope (Datum pristupa, 5.2.2023.)
53. <https://en.zag.si/en/equipment/cdfd7a2c9d10196cc0e05056bcc059c8> (Datum pristupa 5.2.2023.)
54. Taylor Hobson, *Surtronic 25 User's guide*, Issue 4, England 2004.
55. <https://nanocomposix.com/pages/silica-physical-properties> (Datum pristupa 5.2.2023.)

-
56. C-A. Ghiorghita, F. Bucatariu, E. G. Hitruc, M. Mihai, E. S. Dragan, *Mater. Plast. (Bucharest, Rom.)*, **51**(2014) 323-327.
57. P. Bryk, E. Korzeniewski, G.S. Szymanski, P. Kowalczyk, K. Tepiowski, A. P. Terzyk, *Materials*, **13**(2020) 1554.

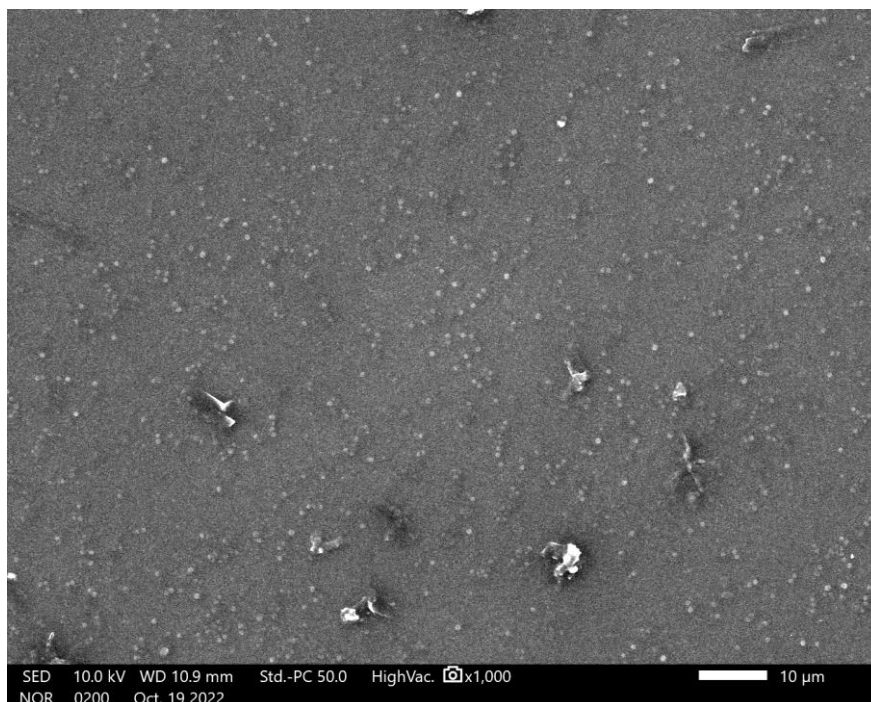
§ 8. DODATAK



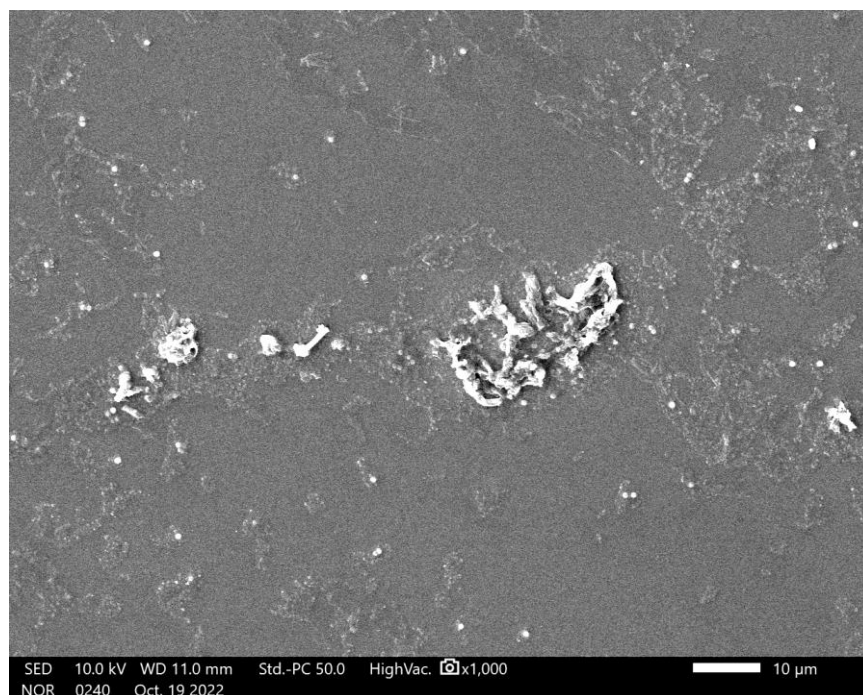
Slika D1. SEM snimka površine SiO₂ pločice bez adheriranih bakterija



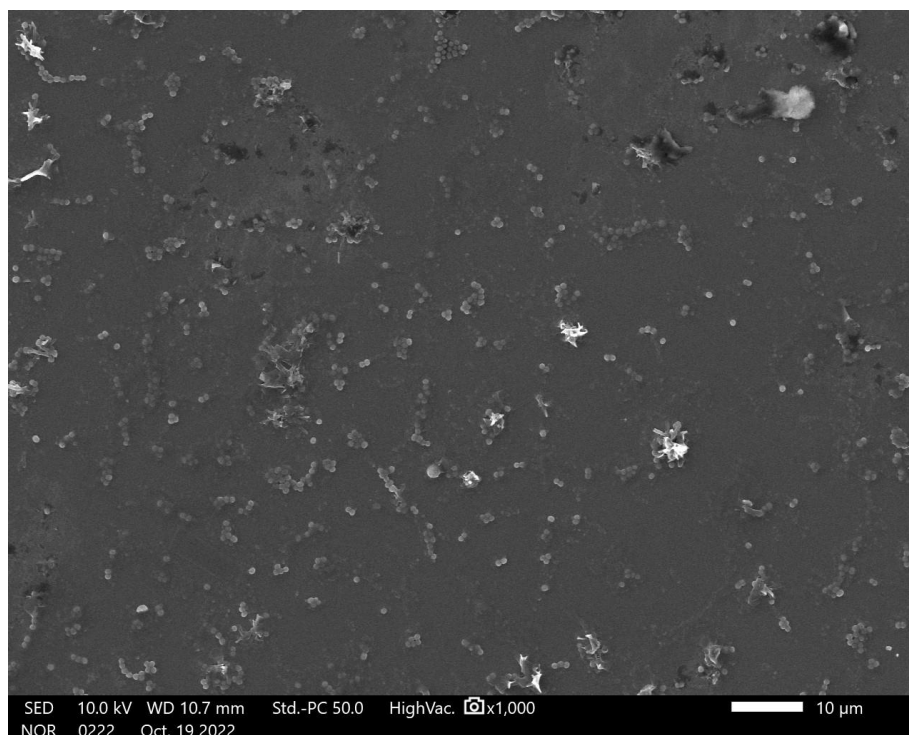
Slika D2. SEM Snimka kontaminirane kolonije bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 adheriranih na (CS-PAA)₅ višesloj



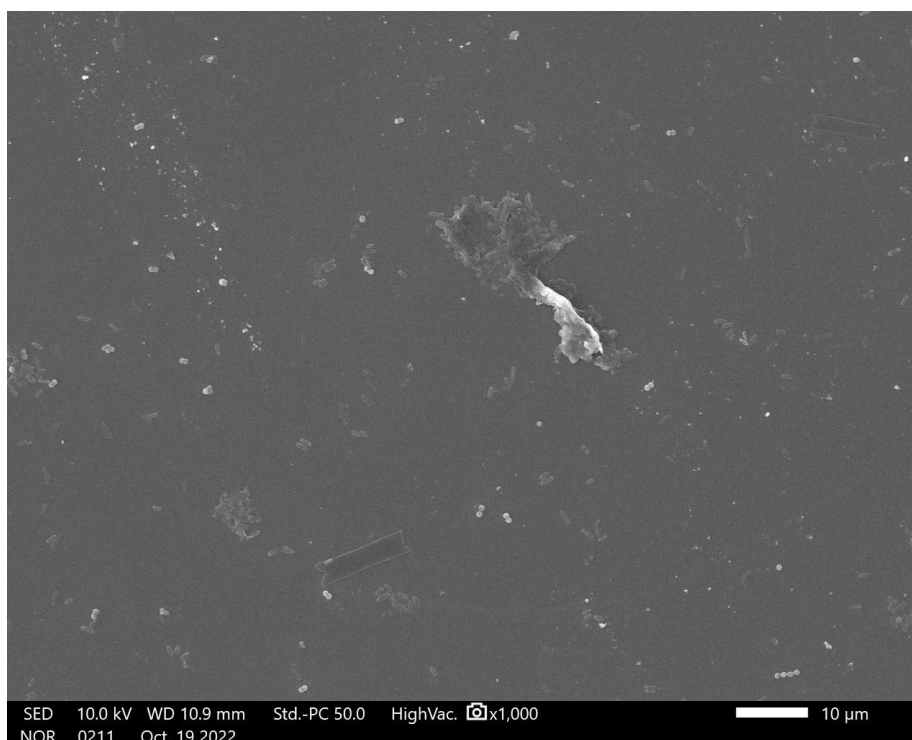
Slika D3. SEM Snimka kontaminirane kolonije bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 adheriranih na SiO₂ pločicu



Slika D4. SEM Snimka kontaminirane kolonije bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 adheriranih na (CS-PAA)₅-Lys višesloj



Slika D5. SEM Snimka kontaminirane kolonije bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 adheriranih na (CS-PAA)₄-CS-Lys višesloj



Slika D6. SEM Snimka kontaminirane kolonije bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 adheriranih na (CS-PAA)₄-CS višesl

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Luka Babić

Datum rođenja: 19. veljače, 1995.

Mjesto rođenja: Čakovec

Obrazovanje

2001.–2009. II Osnovna škola, Čakovec

2009.–2013 Gimnazija Josipa Slavenskog, Čakovec

2013.–2019. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2022. (svibanj) - CEEPUS Stručna praksa - Colloids and nanomaterials in education and research, Zdravstvena Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

2022. (listopad) - CEEPUS Stručna praksa - Colloids and nanomaterials in education and research, Zdravstvena Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

Nagrade i priznanja

2019. Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici - DAN KARIJERA – WORKIN' SCIENCE

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

2015. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Luka Babić, Tin Klačić, Jasmina Jukić, Anamarija Zore, Roman Štukelj, Andrijana Sever Škapin, Klemen Bohinc, Davor Kovačević, (poster) Antibacterial properties of chitosan/poly(acrylic acid) polyelectrolyte multilayer with an adsorbed lysozyme layer, 7. Simpozij studenata kemičara (SISK 7), Zagreb, Hrvatska, listopad 2022.