

## KOLOIDNO SREBRO V DENTALNIH PRODUKTIH



### RAZISKOVALNA NALOGA

### PODOROČJE: KEMIJA

Mentorici:

Anja Korent<sup>1</sup>

Alenka Mozer<sup>2</sup>

Avtorici:

Laura Drašler<sup>2</sup>

Ula Dragman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Inštitut Jožef Stefan

<sup>2</sup>Gimnazija Vič

Ljubljana, Slovenija

2018 - 2020

# ZAHVALA

Najprej se zahvaljujema šolski mentorici Alenki Mozer, da nama je omogočila izdelavo raziskovalne naloge, konstruktivne predloge ter razlago teoretičnih osnov in pomoč pri zapisu. Zahvaljujema se tudi zunanji mentorici Anji Korent za razlago teoretičnih osnov, pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela, urejanju rezultatov ter oblikovanju naloge.

Zahvala gre tudi Odseku za nanostrukturne materiale na Institutu »Jožef Stefan« in Središču karijerne orientacije zahod za omogočeno izvedbo raziskovalne naloge.

# VSEBINA

1	UVOD	1
2	RAZISKOVALNI PROBLEM	2
3	LITERATURNI PREGLED	3
3.1	NANODELCI	3
3.2	KOLOIDNO SREBRO	5
3.2.1.1	Biosinteza srebrovih nanodelcev iz bazilike	8
3.3	KARAKTERIZACIJA NANODELCEV	9
3.3.1	Suhi vzorci	9
3.3.1.1	Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) in energijska disperzijska spektroskopija (EDS)	9
3.3.2	Mokri vzorci	10
3.3.2.1	Merjenje površinskega naboja - zeta potencial	10
3.3.2.2	Določanje velikosti delcev s pomočjo laserskega sipanja svetlobe (DLS)	11
3.3.2.3	Kolorimetrična detekcija	11
4	CILJI RAZISKAVE IN HIPOTEZA	14
4.1	BIOSINTEZA SREBROVIH NANODELCEV (Ag ND)	15
4.2	KOLORIMETRIČNA DETEKCIJA NANOSREBRA V DENTALNIH PRODUKTIH	19
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
5.1	BIOSINTEZA	24
5.1.1	Sinteza in spremljanje nastajanja	24
5.1.2	Karakterizacija sintetiziranih nanodelcev	26
5.2	KOLORIMETRIČNA DETEKCIJA DENTALNIH PRODUKTOV	30
5.2.1	Preverjanje metode	30
5.2.1.1	Slepa proba	30

5.2.1.2	Referenčni vzorec	31
5.2.2	Kolorimetrična detekcija srebra v dentalnih vzorcih	33
5.2.3	Karakterizacija vzorcev dentalnih produktov (z elektronsko vrstično mikroskopijo - SEM)	36
5.2.3.1	Zobna ščetka	36
5.2.3.2	Ustna vodica in zobna pasta	38
6	ZAKLJUČKI	39
7	KOMENTAR IN NADALJEVANJE	41
8	BIBLIOGRAFIJA	42

# KAZALO SLIK IN TABEL

Slika 1: Lotosov efekt v naravi (a), računalniški prikaz kapljic vode in delcev umazanije na listu (b) in kontaktni kot kapljice s površino lista (c)	3
Slika 2: Razmerje med površino in volumnom	4
Slika 3: Primer koloidnega sistema iz narave (mleko, razredčeno z vodo) in vidna pot žarka	6
Slika 4: Ženska in moški z argirijo	7
Slika 5: Graf uporabe različnih nanodelcev v produktih na trgu v letih 2006, 2011 in 2013	8
Slika 6: Reakcija nastanka srebrnih delcev	9
Slika 7: Graf zeta potenciala (a) in shematski prikaz električnega dvosloja (b)	10
Slika 8: Shematski prikaz dinamičnega sipanja svetlobe	11
Slika 9: Spekter vidne svetlobe	12
Slika 10: Barvni krog	12
Slika 11: Shema redoks reakcije med $\text{NaBH}_4$ in MM, kjer so srebrovi nanodelci katalizator	13
Slika 12: Bazilika z vrta	16
Slika 13: Priprava ekstrakta: kuhanje bazilike (a), filtriranje (b) in končni produkt (c)	16
Slika 14: Centrifugiranje sintetiziranih nanodelcev	17
Slika 15: Sintetizirani nanodelci pred centrifugiranjem (a) in po centrifugiranju (b)	17
Slika 16: Nosilec s kapljicami sintetiziranega srebra v različnih minutah (a) in presublimacija ogljikove nitke (b in c) na le-tega	18
Slika 17: Dentalni produkti	19
Slika 18: Nerazredčena ustna vodica (levo) in razredčena ustna vodica (desno)	19
Slika 19: Zobna pasta v vodi (a), v ultrazvočni kopeli (b) in po poteku le-te (c)	19
Slika 20: Zobna ščetka v umetni slini (levo) in vodovodni vodi (desno)	20
Slika 21: Pipetiranje vzorcev za kolorimetrično detekcijo	20
Slika 22: Kiveta z metilen modrim v sintetiziranih nanodelcih	22

Slika 23: Priprava vzorca z zobno pasto	22
Slika 24: Nosilec z vzorci dentalnih produktov	23
Slika 25: Sprememba barve zaradi nastanka srebrovih nanodelcev. Ekstrakt bazilike (a) se iz svetlo rumene barve ob dodatku $\text{AgNO}_3$ (b) obarva svetlo rjava. Po koncu sinteze (c) je vsebina čaše temno rjava.	24
Slika 26: Absorbanca reagentov (svetlo modra - $\text{AgNO}_3$ in oranžna - ekstrakt bazilike) za sintezo in spremljanje poteka sinteze ter nastajanja Ag ND v časovnem obdobju, merjenem po dodatku ekstrakta	26
Slika 27: Mikroskopske slike sintetiziranih delcev (dve povečavi, 5000x in 30000x) med nastajanjem: 1 min (a), 2 min (b), 3 min (c), 4 min (d), 5 min (e), in 7 min (f) od dodatka $\text{AgNO}_3$	27
Slika 28: Mikroskopska slika končnih delcev pri različnih povečavah: 5000x (a), 30000x (b), 40000 (c)	28
Slika 29: Elementarna sestava končnih sintetiziranih delcev (EDS)	29
Slika 30: Porazdelitev velikosti končnih sintetiziranih delcev	30
Slika 31: Absorbanca barvila metilen modro v času 0 brez prisotnosti vzorca	31
Slika 32: a) Opazovanje poteka kolorimetrične metode brez prisotnosti delcev (modra: umetna slina kot vzorec; oranžna: voda kot vzorec) in b) slika MM v času 0 (1) in po določenem času poteka eksperimenta (2, 3)	32
Slika 33: Spremljanje kolorimetrične metode (reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom) z uporabo sintetiziranih Ag ND	32
Slika 34: Verifikacija kolorimetrične metode. Primerjava poteka reakcije v primeru prisotnosti Ag nanodelcev (oranžna) oz. brez nanodelcev (modra)	33
Slika 35: Razbarvanje metilen modrega ob prisotnosti referenčnega vzorca	33
Slika 36: Kolorimetrično zaznavanje poteka reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom v prisotnosti vzorcev dentalnih produktov: modra- voda, oranžna – ustna vodica, siva – voda z delci iz zobne ščetke	34
Slika 37: Kolorimetrično zaznavanje poteka reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom v umetni slini (modro) in zobni ščetki, namakani v umetni slini (oranžno)	34
Slika 38: Absorbanca MM v prvi sekundi reakcije med MM in $\text{NaBH}_4$ v prisotnosti vzorca zobne paste (modra) v primerjavi z vodo (oranžna)	35
<i>Slika 39: Mikroskopska slika ščetine zobne ščetke: slika sekundarnih elektronov – morfologija (a), slika povratno sipanih elektronov – kompozicija (b)</i>	36

<i>Slika 40: Elementarna sestava ščetine zobne ščetke, analizirana z EDS</i>	36
<i>Slika 41: SEM slika kapljice umetne sline, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka</i>	37
<i>Slika 42: Elementarna sestava kapljice umetne sline, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka</i>	37

# SEZNAM KRATIC IN SIMBOLOV

A	absorbanca	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	mononatrijev fosfat
cm	centimeter	NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje
l	dolžina poti	nm	nanometer
EDS	energijska disperzijska spektroskopija	$\text{NaBH}_4$	natrijev borohidrid
$\epsilon$	ekstinkcijski koeficient absorpcije	NaCl	natrijev klorid
g	gram	cca.	približno
$\text{CaCl}_2$	kalcijev klorid	rpm	»rotation per minute«
KCl	kalijev klorid	AgND	srebrovi nanodelci
c	koncentracija	$\text{Ag}^+$	srebrov ion
DLS	lasersko oz. dinamično sipanje svetlobe	$\text{AgNO}_3$	srebrov nitrat
MM	metilen modro	$\text{H}_2\text{O}$	voda
mL	mililiter	V	volt
mm	milimeter	SEM	vrstična elektronska mikroskopija
M	molar		



# POVZETEK

V zadnjem času se je uporaba nanodelcev v različnih produktih na tržišču močno povečala. Proizvajalci praviloma oglašujejo zgolj pozitivne učinke in negativnih sploh ne omenijo. Med pogosteje uporabljenimi nanodelci je koloidno srebro (srebrovi nanodelci razpršeni v nekem mediju), saj je znan po svojih antibakterijskih učinkih. Zato smo v raziskovalni nalogi objektivno predstavili pozitivne in negativne lastnosti koloidnega oz. nanosrebra. Osredotočili smo se na dentalne produkte z vsebnostjo nanosrebra, saj z uporabo le-teh prisotne nanodelce tudi delno zaužijemo, kar je lahko potencialno nevarno, in analizirali tri različne izdelke: zobno ščetko, zobno pasto in ustno vodico.

S pomočjo kolorimetrične detekcije smo želeli ugotoviti, kolikšna je vsebnost koloidnega srebra v omenjenih produktih. Ker smo analizirali različne produkte, nas je zanimalo, ali je ta metoda primerna za vse tri tipe izdelkov. Rezultate kolorimetrične detekcije smo preverili z rezultati, ki smo jih dobili z uporabo drugih metod karakterizacije (vrstična elektronska mikroskopija - SEM, lasersko sipanje svetlobe - DLS). Za preverjanje metode smo z biosintezo naredili svoj referenčni vzorec. Biosintezo, ki je relativno nova in okolju prijazna reakcija, smo izvedli z ekstraktom bazilike in s tem dobili približno 100 nm velike srebrove nanodelce.

S karakterizacijo dentalnih produktov smo ugotovili, da je vsebnost nanodelcev v naših preiskovanih vzorcih zelo majhna (zobna ščetka) oz. je celo nismo zaznali. Ker je bila kolorimetrična detekcija referenčnega vzorca uspešna, lahko potrdimo, da s to metodo lahko učinkovito zaznamo prisotnost nanosrebra. Žal pa je metoda primerna le za vzorce, ki nimajo lastne obarvanosti, saj le-ta spremeni absorpcijo. Tudi SEM analiza se je izkazala za učinkovito zgolj pri zaznavanju nanosrebra v referenčnem vzorcu, a ni primerna za analizo kompleksnih vzorcev, ki vsebujejo organske snovi (npr. zobna pasta in ustna vodica).

**Ključne besede:** nanosrebro, kolorimetrična detekcija, biosinteza, SEM, DLS

# 1 UVOD

Nanodelci so od nekdanj povsod okoli nas, le mnogi med nami se tega ne zavedajo. Ob vsakem brušenju in gorenju smo jim izpostavljeni, polimerne tkanine (npr. flis) jih pri vsakem pranju sproščajo v vodo (t.i. mikroplastika) in podobno. Nanoznanost kot posebna veja znanosti ima svoje začetke šele v drugi polovici prejšnjega stoletja. (1) Znanstveniki so spoznali, da imajo nanodelci bistveno drugačne lastnosti kot makrodelci. Na osnovi novih znanj o lastnostih nanodelcev so le-te začeli načrtno uporabljati v izdelkih, ki te lastnosti v polni meri izkoristijo, razvijati se je začela nanotehnologija.

Avtorici te raziskovalne naloge sva zasledili reklame za dentalne izdelke, ki vsebujejo koloidno srebro, in ti izdelki naj bi bili učinkovitejši v boju z mikrobi kot navadni izdelki za nego zob. Želeli sva raziskati to področje, zato smo se s pomočjo šolske mentorice povezali z IJS oz. z zunanjo mentorico, z Odseka za nanostrukturne materiale (K7).

V nalogi smo se osredotočili na nanodelce srebra in že prej omenjeno koloidno srebro. Za razumevanje naloge je pomembno, da ločimo pomen teh dveh pojmov. Nanodelci srebra so delci srebra z vsaj eno dimenzijo, ki je manjša od 100 nm. Najpogosteje jih najdemo razpršene oz. dispergirane v tekočem mediju ali nanosene na nek drug material (npr. tekstilna vlakna, plastika); s tem pa dobimo koloidno srebro. Preučevani dentalni produkti vsebujejo srebrove nanodelce, ki jih lahko po definiciji imenujemo tudi koloidno srebro. Vendar pa v tej nalogi uporabljamo izraz srebrni nanodelci (AgND), ki je (kot je že pojasnjeno) širši izraz, ki zajema obe vrsti delcev. (6)

Srebrovi nanodelci se danes prodajajo v obliki različnih pripravkov alternativne medicine oz. so na trgu prisotni v izdelkih, kot so zobne kreme, ščetke za zobe, ustne vodice. Ljudje se ne zavedamo, da učinki le-teh delcev niso le pozitivni. Ker so snovi, ki jih zaužijemo, za nas bolj nevarne kot tiste, ki jih nanašamo na kožo ali dihamo, smo želeli raziskati in ugotoviti pozitivne in negativne plati dentalnih izdelkov s koloidnim srebrom oz. srebrovimi nanodelci, saj je pri teh možnost zaužitja v določenih količinah precej verjetna.

# 2 RAZISKOVALNI PROBLEM

Koloidno srebro je znano po svojih antimikrobnih učinkih. (2) (3) (4) (5) Mnogi proizvajalci produktov s koloidnim srebrom to močno izpostavljajo. Negativnih učinkov pa kljub pomisleku strokovnjakov (6) (7) ne omenijo. Zdravstvene institucije (npr. NIJZ) odsvetujejo uporabo nanodelcev in tudi konkretno nanosrebra.

Avtorji raziskovalne naloge smo sklenili, da imajo, izmed vseh izdelkov s koloidnim srebrom oz. nanosrebrom, dentalni izdelki verjetno bolj izrazite negativne učinke, saj nekaj koloidnega srebra zaužijemo.

Želeli smo sistematično pogledati različne vrste dentalnih izdelkov, zato smo za potrebe raziskovalne naloge preko spleta kupili tri različne dentalne izdelke, ki vsebujejo nanosrebro v različnih oblikah:

- zobne ščetke (Doctor Plotka's Mouthwatchers) (8),
- antimikrobna zobna krema (Dentavit) (9),
- ustna vodica (Silver Botanicals) (10).

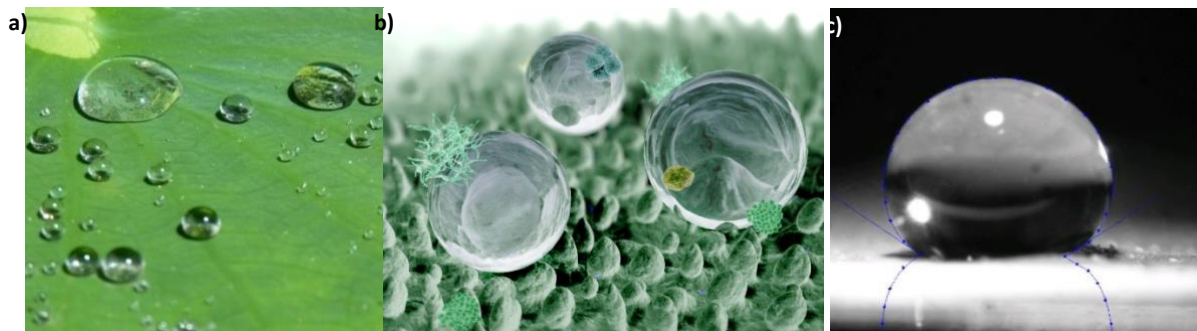
Proizvajalci teh izdelkov trdijo, da so zaradi vsebnosti nanosrebra in njihovega antimikrobnega učinka boljši od ostalih izdelkov na trgu, kar nam poraja senco dvoma, saj ima vsak izdelek pozitivne in negativne lastnosti. Pri uporabi takih dentalnih izdelkov zagotovo nekaj koloidnega srebra oz. nanosrebra pride v telo preko prebavnega sistema, zato so potencialni negativni učinki in vplivi na naše zdravje bolj zaskrbljujoči kot pri npr. nanosih izdelkov na kožo.

# 3 LITERATURNI PREGLED

## 3.1 NANODELCI

Nanotehnologija je področje znanosti, ki se ukvarja z nanomateriali. Razvijati se je začela v drugi polovici prejšnjega stoletja. Z njenim razvojem mnogi napovedujejo industrijsko revolucijo, saj ima oz. bo imela pomembno vlogo v avtomobilski industriji (avtomobilski odbijači so lažji ter bolj odporni na udarce in praske), čistilnih napravah (zadržijo 99,99% virusov), tekstilni industrij, medicini (nanoroboti bodo sposobni popravljati prizadete celice ter iskati in uničevati neželene tujke) in računalništvu (nanoprocessorji). Z razvojem nanotehnologije se bomo počasi začeli zavedati, da so nanomateriali povsod okoli nas. (11) Po definiciji iz revije Official Journal of the European Union je nanomaterial »naravna, mešana ali umetna snov, ki vsebuje delce v nevezanem stanju ali v obliki agregatov (delci, ki so sestavljeni iz močno povezanih ali zlitih manjših delcev) ali aglomeratov (skupki šibko povezanih delcev)« in ima 50% ali več delcev (pri razporeditvi snovi po velikosti glede na število) eno ali več zunanjih dimenzij v razponu velikosti od 1 do 100 nm. (12) (13)

Kljub temu, da je uporaba nanodelcev v industriji relativno novo področje, so v naravi od nekdaj ključni pri nekaterih pojavih, kot je npr. lotosov efekt (prikazan na sliki 1). Deluje na principu superhidrofobnosti in ga bomo v nadaljevanju natančneje razložili.

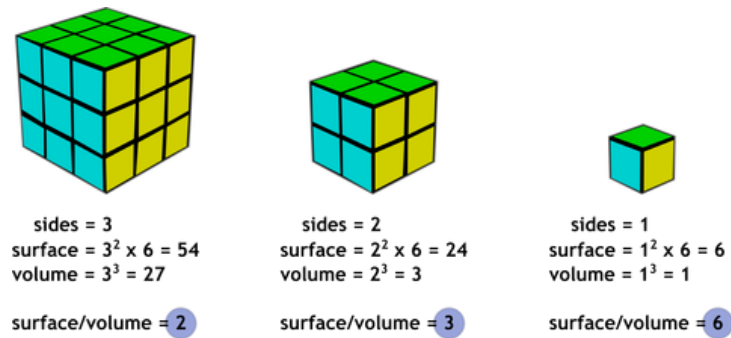


Slika 1: Lotosov efekt v naravi (a), računalniški prikaz kapljic vode in delcev umazanije na listu (b) in kontaktni kot kapljice s površino lista (c)

Vir (a): (14)

Vir (b, c): (15)

Najpomembnejša fizikalna lastnost nanodelcev je njihova velikost, saj ravno to najbolj vpliva na drugačnost od makrodelcev. Manjši kot je nanodelec, večji je njegov koeficient razmerja med površino in volumnom; kot je vidno na sliki 2, se volumen manjša z velikostjo, ob tem pa se površina večja. Večja površina pomeni večje število atomov koloidnega delca na površini in s tem večjo izpostavljenost okolici. To je neke vrste kemijska aktivnost, pri kateri so atomi na pol vezani na površino, hkrati pa lahko tvorijo vezi z okolico. (16) To je lahko pozitivno, saj so zato dobri katalizatorji, in negativno, saj lahko povzročijo nezaželene reakcije v našem organizmu in se hitro vežejo na sluz. (17) (18)



Slika 2: Razmerje med površino in volumnom

Vir: (18)

Nanodelci se zaradi velike kemijske aktivnosti tudi lažje povezujejo v medsebojne večje skupke, ki smo jih omenili v definiciji (agregati, aglomerati). Ločimo dva različna načina združevanja: agregacija in aglomeracija. Agregacija je združevanje manjših delcev v večje (agregate), pri čemer vsak delec ohrani svoje lastnosti (npr. obliko). Ti delci so med seboj močno povezani oz. zlit. Aglomeracija pa je združevanje manjših delcev, ki so med seboj šibko povezani, v aglomerate. (18) (17) Na združevanje vplivajo oblika, kemijska sestava in električna nabitost oz. polarnost delca. Če imajo delci enak naboj do združevanja praviloma ne prihaja. Če pa imajo (velik) nasprotni naboj, se privlačijo in združujejo.

Oblika delca natančno določa njegovo površino in na tej površini se lahko ustvarijo napetosti oz. električni naboj (površinska prosta energija), ki vpliva na kemijske in fizikalne lastnosti delca. Oblika je včasih pomembnejša od kemijske sestave. Kot je zapisano že v definiciji, delec uvrščamo pod nanodelce tudi, če je le v eni dimenziji manjši od 100 nm. Zato poleg okroglih nanodelcev poznamo tudi nitkaste, igličaste in tanke lističe, ki prav tako spadajo pod nanodelce. Majhni in okrogli delci lažje prehajajo skozi filtre, saj se hitro gibljejo v plinih in tekočinah. Nitkasti in večji delci pa imajo večjo maso, zato so podvrženi sedimentaciji oz. posedanju in jih je lažje ujeti s filtrom ter pogosteje trčijo in se pri tem združijo. Posebna oblika nanodelcev so tanki lističi delcev, ki so v eni dimenziji tanjši od sto nanometrov, a so kar v dveh dimenzijah precej večji, zato pravimo, da so dvodimenzionalni. Običajno se gubajo pod vplivom trkov okoliških delcev in so energijsko nestabilni, zato imajo neenakomerno razporeditev naboja, zaradi česar se vežejo na podlago in jih je iz nje težko odstraniti. (18) (17)

Pomembna lastnost nanodelca je tudi kemijska sestava (osnovni gradniki snovi). Pomembna je s stališča topnosti v vodi in bioloških tekočinah ter sposobnosti omočitve. Glede na sposobnost omočitve snovi ločimo na hidrofilne (omočljive) in hidrofobne (neomočljive). Ta lastnost je lahko za nanodelce nekega elementa drugačna kot za makrodelce. Odličen primer hidrofobnosti nanodelcev je že omenjeni lotosov efekt (slika 1 a). Da bi pojav razumeli, moramo najprej poznati zgradbo lotosovega lista. Ta ima na površini t.i. papile (slika 1 b), ki so v vseh dimenzijah velike le nekaj mikrometrov, list pa je zaradi tega grob, kar lahko pod vrstičnim elektronskim mikroskopom dobro vidimo. Na tej površini je hidrofobna nanoplast voska. Zaradi nje in grobosti površine (na mikroskopski ravni) je lotosov list superhidrofoben. To pomeni, da ima kaplja vode na njem kontaktni kot oz. kot omočitve, ki je odvisen od ukrivljenosti nanodelcev na površini oz. od njihove velikosti, večji od  $150^\circ$  (slika 1 c). S tem ima zelo majhno stično površino z listom. Zato rečemo, da voda lista ne omoči, omoči pa umazane delce na njem (saj ti z vodo tvorijo bistveno močnejše vezi kot s površino lista). Na ta način voda (in z njo umazanija) zdrsi z lista. Nanodelci, ki sestavljajo plast voska na površini lista, torej niso topni v vodi. Poznamo pa tudi nanodelce,

ki so topni v vodi, kljub temu da makrodelci teh elementov niso. To so nekateri kovinski nanodelci (npr. nanodelci srebra, zlata), katerih oksidi v vodi počasi razpadajo na ione, s čimer lahko povzročajo za organizem nezaželene kemijske reakcije. Zaradi svoje kemijske aktivnosti pa so dobri katalizatorji in imajo antimikrobno delovanje. (19) (14) (24) (16) (20)

V človeško telo lahko nanodelci prodrejo na tri načine: preko kože, prebavil in dihal. Prodor skozi kožo je malo verjeten in hujši samo, če je poškodovana rožena plast kože. Nanodelce tudi zaužijemo, saj so pogosto uporabljeni kot prevleke, ki ohranjajo živilom okus, vlago ter izgled. V prehrani so lahko tudi zaradi mehanske obrabe orodja in onesnaženega okolja med predelavo. Največkrat pa v telo vstopijo preko dihal. Velikost delca je pomemben dejavnik tudi pri potovanju po človeškem telesu: 70 nm delci prodrejo v pljučne mešičke, 50 nm prodrejo v celice, 30 nm prodrejo v celino jedro in ni podatkov o potovanju delcev, ki so manjši 20 nm. (24) Poleg tega pa določa tudi učinkovitost sistemov čiščenja pljuč. Za to so zadolženi makrofagi (bele krvničke), ki pa niso sposobni tako dobro fagocirati (na nek način izločiti) netopnih nanodelcev, zato se v organizmu nabirajo, kar pripelje do vnetja pljuč, s časoma pa do rakovega obolenja. Nanodelci v nekaterih primerih lahko prehajajo med tkivi, kar pomeni, da lahko iz pljučnih mešičkov preidejo v krvni obtok ali pa limfni sistem in dosežejo organe kot so jetra, vranica, možgani, centralni živčni sistem ter kosti. Topni nanodelci (npr. omenjeni kovinski nanodelci) s postopnim raztapljanjem prehajajo v organizmu škodljive ione, ki pa lahko preidejo v krvni obtok. Ob prodoru nanodelcev v možgane začnejo celice, ki ščitijo nevrone, spuščati radikale, ki so del oksidativnega stresa, ta pa povzroča Parkinsonovo in Alzheimerjevo bolezen. (16) (21)

## 3.2 KOLOIDNO SREBRO

V naravi imamo veliko koloidnih sistemov (npr. megla - dispergirane kapljice vode v zraku, majoneza, stepena smetana, dim, pena). Koloidni sistem je sistem iz dveh ali več komponent. Ena ima vlogo topila oz. disperzijskega medija, druge pa so razpršene oz. dispergirane v njem, imenujemo jih dispergirana faza. Delci, ki so razpršeni topilu, so veliki od enega nanometra do enega mikrometra. Ker gre za majhne delce (nanodelce), je koeficient razmerja med površino in volumnom velik, kot smo to opisali v prejšnjem poglavju.

Koloidni sistem z dvema fazama teži k zmanjšanju medfazne površine. To se zgodi z združevanjem manjših delcev v večje (aglomerate). Če je to združevanje preprečeno in delci ostanejo dispergirani v sistemu, govorimo o stabilnem koloidnem sistemu. Takrat je velik odboj med koloidnimi delci oz. prevladuje odbojni potencial. Na to vpliva enak naboj koloidnih delcev na površini, ki je lahko pozitiven ali negativen. (18) (22)



Slika 3: Primer koloidnega sistema iz narave (mleko, razredčeno z vodo) in vidna pot žarka

Na sliki 3 vidimo koloidni sistem (kapljica mleka v vodi), ki smo ga naredili za prikaz Tyndallovega efekta. To je pojav sipanja svetlobe, značilen za vse koloidne raztopine. Posledica tega je motnost in opazna pot žarka svetlobe, saj se svetloba sipa na koloidnih delcih. To je tudi razlog, da vidimo žarek. (18) (22)

Tudi različni nanodelci (npr. nanodelci srebra, zlata, itd.) so lahko dispergirani v koloidni raztopini. Avtorji raziskovalne naloge smo se odločili, da se bomo osredotočili na srebrove nanodelce (Ag ND) oz. nanosrebro, saj je med nanodelci prav to najpogosteje uporabljeno v izdelkih na trgu (kar je razvidno iz grafa na sliki 5). Srebrove nanodelce najpogosteje najdemo razpršene oz. dispergirane v tekočem mediju ali nanosene v nek drug material (npr. tekstilna vlakna, plastika). S tem dobimo koloidni sistem, pri katerem imajo Ag ND vlogo dispergirane faze, celoten sistem pa imenujemo koloidno srebro. V nekaterih vzorcih koloidnega srebra lahko najdemo tudi dispergirane ione. Toksičnost nanosrebra je povezana ravno s sproščanjem ionov iz elementarnega srebra. Ko so na površini delca brez naboja (npr. dispergirano elementarno nanosrebro) nekatere molekule (kot so  $O_2$ , nekateri proteini), se delec oksidira in nastane  $Ag^+$  ion. (7) (28)

Koloidno srebro ima tako pozitivne in kot negativne učinke. Dolgo časa se ljudje negativnih učinkov niso zavedali, zato so koloidno srebro pogosto uporabljali (predvsem zaradi antimikrobnih učinkov). Njegova uporaba je močno razširjena tudi danes, a mnogi strokovnjaki in institucije (kot je npr. Nacionalni inštitut za javno zdravje) so mnenja, da ne bi smela biti. (6) (7)

Srebro so uporabljali že v antiki (npr. za jedilni pribor, shranjevanje vina, vode, itd.). Služilo jim je predvsem zaradi svojih antimikrobnih učinkov, ki so jim bili že takrat znani. Danes smo z mnogimi raziskavami te učinke srebra tudi potrdili in razložili. (2) (3) (4) (5) Znanstveniki so ugotovili, da rast bakterij zavira s sproščanjem srebrovih ionov, ki uničijo proteine na membrani bakterijske celice. To lastnost smo ljudje s pridom izkoriščali vse od časov Starih Grkov in Rimljanov. Ob iznajdbi antibiotikov (v 1. polovici 20. stoletja) se je uporaba srebra za medicinske namene močno zmanjšala, a se je že v 70. letih ponovno uporabljalo v medicini, in sicer za zdravljenje opeklin. Glavni razlog za to je odpornost mikroorganizmov proti antibiotikom. Tudi danes srebro v medicini uporabljamo za zdravljenje kroničnih poškodb kože, opeklin ter dermatoloških bolezni, pri katerih se koža na naraven način ne more več boriti z bakterijami. Z raziskavami so ugotovili, da ima koloidno srebro precej več antimikrobnih učinkov kot elementarno srebro zaradi prej omenjenih posebnih lastnosti nanodelcev (velikost, razmerje med

površino in volumnom). Ravno zaradi teh lastnosti pa znanstveniki menijo, da se nanosrebro ne bi smelo uporabljati, dokler dokončno ne raziščemo vseh njegovih učinkov na naše telo.

Že dolgo je znano, da (tudi kratkoročna) velika koncentracija nanosrebra negativno vpliva na evkariontske celice zaradi sproščanja srebrovih ionov, ki imajo na te celice citotoksične efekte. (3) Vendar ne vemo, kakšen vpliv ima nanosrebro na naše celice ob dolgoročni izpostavljenosti majhni koncentraciji. V vsakdanjem življenju pa se z nanodelci srečujemo ravno v takšnih pogojih. Do zdaj je že dokazano, da lahko povzročajo bolezni dihal, kardiovaskularne bolezni, nevrodegenerativne bolezni in vplivajo na porodno težo novorojenčkov. Sumijo tudi, da lahko povzročajo diabetes, alergije, kožne bolezni, razpad rdečih krvničk, bolezni prebavil, raka ter da so motilci hormonov in vplivajo na reproduktivni sistem. Nevarni so predvsem, ker lahko zaradi svoje majhne velikosti in oblike prehajajo skozi membrane celic in poškodujejo lipidne celične membrane, DNK in beljakovine. Ko so v krvnem obtoku, lahko zaidejo v možgane in se nabirajo v nevronih. (13) (23) (24) (6) (16) (25) Čeprav lahko srebrovi nanodelci skozi membrane prehajajo v organizem, jih je iz organizma težko odstraniti, kar smo natančneje opisali že v prejšnjem poglavju o nanodelcih. Če se srebro akumulira v organizmu, lahko to povzroči bolezensko stanje z imenom argirija (prikazano na sliki 4). To je tudi edina bolezen, ki je neposredno povezana z izpostavljenostjo srebru. Posledica akumulacije srebrovih soli v telesu je modro-siva obarvanost, ki se izraža predvsem na delih, ki so izpostavljeni soncu. (23)



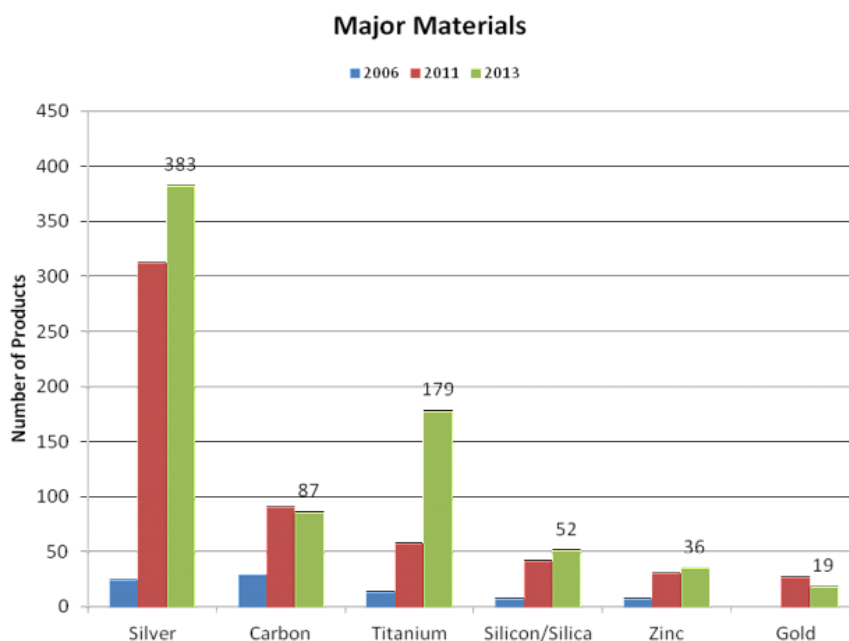
*Slika 4: Ženska in moški z argirijo*

*Vir: (30)*

Intenzivno raziskujejo tudi njihove pozitivne lastnosti in možnosti uporabe v medicini. Nanosrebro je namreč učinkovito pri zdravljenju AIDS-a (napade virus HIV-1 in mu onemogoči učinkovanje na celice), pri diagnostiki različnih bolezni in specifičnem vnosu zdravil. (24) (6) (16) (25)

Danes se koloidno srebro ne uporablja samo v medicini, ampak ga najdemo tudi v različnih produktih na tržiščih. Iz grafa na sliki 5, narejenega v sklopu projekta »The Project on Emerging Nanotechnologies«, je razvidno, da število izdelkov z nanodelci na trgu močno narašča. Med njimi pa najbolj prevladujejo produkti z nanosrebrom. Mnoga podjetja preko Interneta prodajajo kar ustekleničeno koloidno srebro (26). Najdemo ga tudi v mnogih dentalnih in kozmetičnih produktih ter različnih izdelkih za mlajše otroke in dojenčke (npr. v posodah za pijačo). Moramo se zavedati, da nanosrebro nima le pozitivnih učinkov, zato je potrebno razmisliti, če je uporaba le-tega smiselna. Z večjim razvojem nanoznanosti in analize pozitivnih in negativnih učinkov nanodelcev bomo lažje in bolje sprejeli to odločitev.





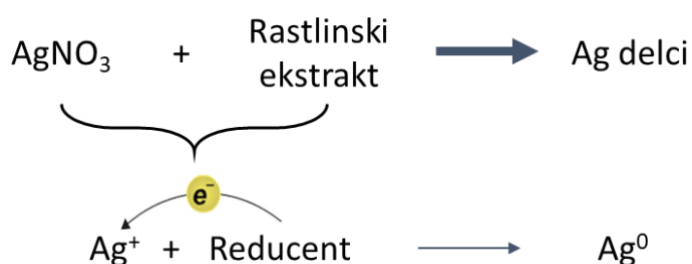
Slika 5: Graf uporabe različnih nanodelcev v produktih na trgu v letih 2006, 2011 in 2013

Vir: (32)

“V Evropski uniji uporaba koloidnega srebra za prehranska dopolnila, kot aditiva pri plastičnih materialih v stiku z živili, za igrače in za nobena zdravila (zaradi pomanjkljive varnosti, kakovosti in učinkovitosti ter nesprejemljivega razmerja med koristjo in tveganjem), ni dovoljena.” (6)

### 3.2.1.1 Biosinteza srebrovih nanodelcev iz bazilike

Sami nanodelci sicer niso škodljivi za okolje, pri njihovi sintezi pa se uporabljajo številne kemikalije, ki so toksične in s tem onesnažujejo okolje. Biosinteza nanodelcev namesto škodljivih kemikalij uporablja biološke vire in je s tem okolju prijazna. Najpogosteje se za biosintezo nanodelcev uporabljajo mikroorganizmi, encimi in rastlinski ekstrakti različnih rastlin (27) (Žajbelj (25), Indijski lotos (28), Sacha Inchi (29), Magnolija (30), Bazilika, itd.). Pri raziskovalni nalogi smo se odločili za uporabo bazilike, ker je bila najlažje dostopna.



Slika 6: Reakcija nastanka srebrovih delcev

Bazilika (*Ocimum basilicum*) je dišavnica, ki se zaradi vsebnosti zdravju koristnih snovi (npr. citral, geraniol) uporablja tudi v tradicionalni medicini. Molekule v ekstraktu bazilike, ki so ključnega pomena za sintezo nanodelcev, so encimi, flavonoidi, steroli, terpenoidi, fenoli, vitamini, proteini, aminokisljine in

polisaharidi, ki imajo pomembno vlogo pri redukciji srebrovih (Ag<sup>+</sup>) ionov (slika 6). (31) (27) Reakcija, ki na ta način poteče, se imenuje redoks reakcija. To je reakcija pri kateri pride do prenosa elektronov med snovmi. Elektroni prehajajo od reducenta, ki odda elektrone (se oksidira) do oksidanta, ki sprejme elektrone (se reducira).

## 3.3 KARAKTERIZACIJA NANODELCEV

Za poglobljeno razumevanje nanodelcev moramo poznati njihove lastnosti, kot so velikost, oblika, naboj, stabilnost, razporeditev, saj le-te bistveno vplivajo na njihove učinke. Te lastnosti določimo s karakterizacijo vzorcev. Ker okolje vpliva na lastnosti nanodelcev, jih moramo analizirati tako v suhem kot v mokrem okolju. Ravno zaradi vpliva okolja na lastnosti, so nekatere metode primerne le za suhe vzorce, druge pa le za mokre.

### 3.3.1 Suhi vzorci

Suhe vzorce nanodelcev označujemo kot čist, suh prah. V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali z enim načinoma karakterizacije suhih nanodelcev (vrstično elektronsko mikroskopijo SEM). Če imamo nanodelce v mokrem okolju in jih želimo karakterizirati, jih moramo prej posušiti.

#### 3.3.1.1 Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) in energijska disperzijska spektroskopija (EDS)

Koloidni delci so običajno premajhni, da bi jih videli pod optičnim mikroskopom, saj je ločljivost tega mikroskopa premajhna. Pri elektronski mikroskopiji je ločljivost mikroskopa povečana, saj z uporabo elektronov zmanjšamo valovno dolžino svetlobe, ki jo uporabljamo pri opazovanju. Zato se za opazovanje tako majhnih delcev, kot so nanodelci, uporablja elektronski mikroskop. Mi smo uporabili vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM), ki za skeniranje uporabi zelo ozek žarek visokoenergijskih elektronov, ki potujejo skozi ustvarjen vakuum in interagirajo z vzorcem. Elektrone, ki potujejo do vzorca in z njim interagirajo, imenujemo primarni elektroni. Če vzorec ni prevoden, elektroni ne morejo interagirati z njim, zato je pred mikroskopiranjem potrebno omogočiti prevodnost vzorca (npr. nanj presublimirati grafit). Vzorec emitira različne signale (sekundarni in povratno sipani elektroni, rentgenski žarki in vidna svetloba), ki so posledica interakcije vzorca s primarnimi elektroni. Te signale z elektronskim vrstičnim mikroskopom zaznamo z detektorji in lahko prikažemo na fluorescentnem zaslonu ter fotografiramo. Te fotografije so črno-bele, saj imajo elektroni, ki jih zaznavamo manjšo valovno dolžino od svetlobe. V primeru, kadar imamo v vzorcu prisotnost več bioloških molekul, pritrjenih na površino, je lahko samo opazovanje vzorca oteženo zaradi »kurjenja« (posledica ne prevajanja bioloških molekul) molekul na površini. (17)

Različne signale, ki jih vzorec emitira, zaznavamo z različnimi detektorji. Če želimo slike, ki jih dobimo z detekcijo signalov razumeti, moramo vedeti, kako signali nastanejo. Ko na vzorec pošljemo primarne elektrone, se le-ti sipajo na jedrih atomov. Te (odbite) elektrone imenujemo povratno sipani elektroni. Na različnih atomih se različno sipajo, zato so elementi z večjim vrstnim številom (npr. kovine) na SEM sliki svetlejši od elementov z manjšim vrstnim številom. Poleg povratno sipanih elektronov poznamo tudi sekundarne elektrone. To so tisti elektroni, ki izhajajo iz vzorca kot posledica interakcije s primarnimi. (18) (38)

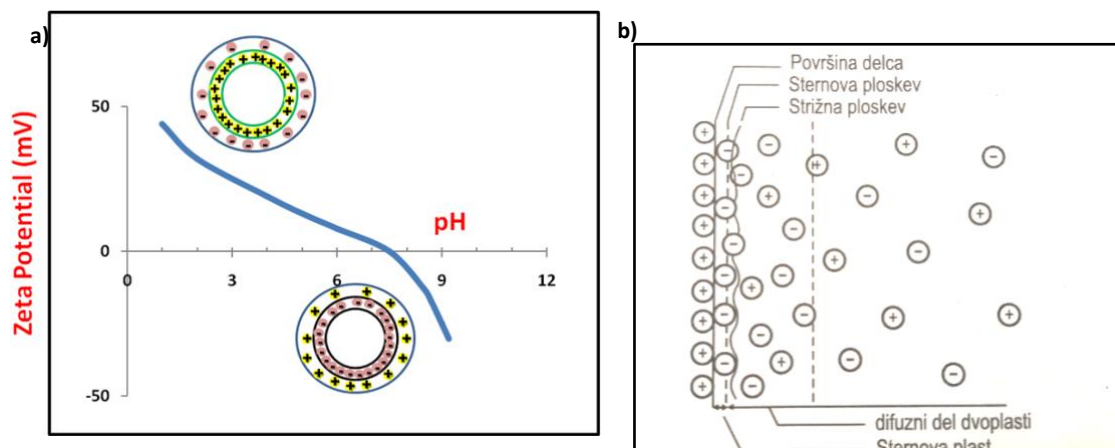
Pomembna metoda, ki je tesno povezana s SEM, je energijska disperzijska spektroskopija (EDS). S to metodo lahko natančno določimo elementno sestavo vzorca. Deluje na podlagi detekcije rentgenskih žarkov (žarki X). Ko primarni elektroni interagirajo z atomi na površini vzorca, elektroni v teh atomih preidejo v vzbujeno stanje in nato nazaj v osnovno, pri čemer se sprostijo omenjeni karakteristični žarki X. Tako lahko zaznamo elemente od ogljika do urana tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Elementov z majhnim vrstnim številom (H, He, Li) pa ne moremo zaznati, saj imajo premajhno atomsko maso. (18) (38)

### 3.3.2 Mokri vzorci

S pojmom »mokri nanodelci« označujemo nanodelce, dispergirane v tekočem mediju. Tekoči medij je lahko voda/krema in podobno. V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali s tremi različnimi načini karakterizacije mokrih nanodelcev: določanje velikosti delcev s pomočjo laserskega sipanja svetlobe, merjenje površinskega naboja in kolorimetrična detekcija.

#### 3.3.2.1 Merjenje površinskega naboja - zeta potencial

Kot smo že omenili, imajo koloidni delci na površini pozitiven ali negativen naboj. Razlog za to je električni dvosloj. Sloj, ki je tesno ob nanodelcu, imenujemo Sternov sloj, na zunanjem delu pa je difuzno področje. Ti dve plasti meji Sternova ploskev, ob njej pa je (rahlo bolj oddaljena od površine delca) tudi strižna ploskev, kjer prihaja zaradi gibanja nabitih delcev v mediju do trenja, ustvarjenega pod vplivom električnega polja. Potencial na strižni ploskvi imenujemo zeta potencial oz. elektrokinetični potencial. Določimo ga eksperimentalno. (18) Večji kot je zeta potencial, večji je odboj med delci in s tem stabilnost sistema.



Slika 7: Graf zeta potenciala (a) in shematski prikaz električnega dvosloja (b)

Vir (a): (39)

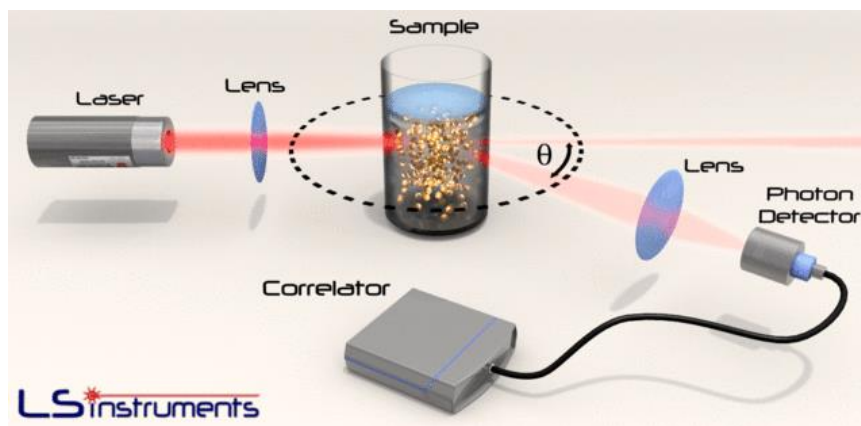
Vir (b): (17)

pH medija vpliva na zeta potencial. Če je pH kisel, površina zaradi prisotnosti pozitivnih ionov, ki privlačijo negativne, postane negativno nabita. Bolj kot je bazično okolje, bolj površina postaja pozitivno nabita. Okoli določenega pH je izoelektrična točka, kjer je zeta potencial enak 0. Takrat se tvorijo aglomerati.

### 3.3.2.2 Določanje velikosti delcev s pomočjo laserskega sipanja svetlobe (DLS)

Velikost delcev vpliva na različne učinke snovi. Kot smo že omenili, je od tega odvisen koeficient med površino in volumnom. Če želimo delcem določiti velikost, lahko za to uporabimo lasersko oz. dinamično sipanje svetlobe (DLS). Če žarek svetlobe usmerimo na vzorec, se bo nekaj svetlobe na delcih, ki so večji od valovne dolžine svetlobe, sipalo (izhajalo iz vzorcev v vseh mogočih smereh) pod kotom, ki je odvisen od velikosti delca. Večji delci sipajo svetlobo pod manjšimi koti kot manjši delci. Meritev kotne odvisnosti svetlobe omogoči določitev porazdelitve delcev po velikosti. Ti se naključno gibljejo, zato delcu glede na to lahko izračunamo t.i. difuzijski koeficient, ki je povezan z velikostjo delca oz. hidrodinamskim premerom. Ta predstavlja premer iona ter vse molekule topila, ki jih privlači in s tem tvorijo nekakšen ovoj. Moramo pa se zavedati, da ta teorija velja za krogelno simetrične delce. (18) (33)

Razporeditev delcev po velikosti je lahko monomodalna (z enim vrhom), bimodalna (z dvema vrhovoma) ali multimodalna (s tremi vrhovi). Natančneje jo določa polidisperzni indeks, ki nam pove, kako široka oz. ozka je. Velik polidisperzni indeks je pokazatelj heterogenosti vzorca glede na velikost. (41)



Slika 8: Shematski prikaz dinamičnega sipanja svetlobe

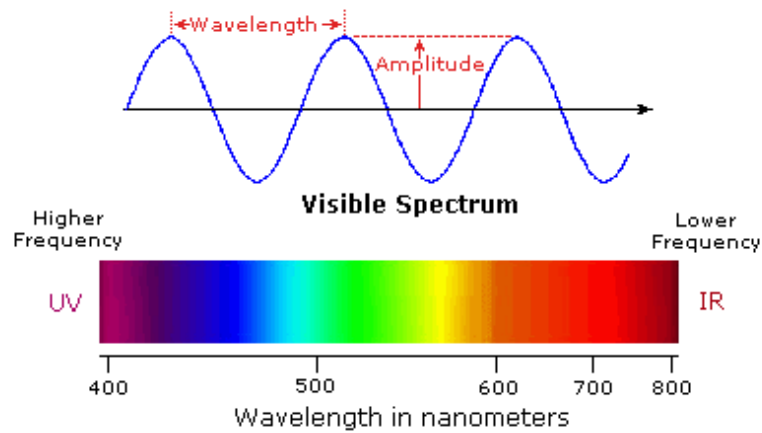
Vir: (40)

### 3.3.2.3 Kolorimetrična detekcija

Za zaznavanje nanodelcev poznamo več različnih načinov. Skoraj vsi zahtevajo izurjeno osebje za upravljanje dragih inštrumentov. Ena takih naprav je elektronski vrstični mikroskop (SEM). Priprava vzorcev za to metodo zahteva veliko časa, saj moramo omogočiti prevodnost (npr. z napršitvijo grafita). S tem imamo tudi težave s »kurjenjem« molekul biološkega vzorca. Teh problemov pri kolorimetrični detekciji nimamo, saj ta temelji na zaznavanju spremembe barve vzorca in sama struktura snovi v vzorcu ne vpliva na njeno delovanje. (40)

Pod kolorimetrično detekcijo spada spektrofotometrija. Temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Svetloba potuje skozi vzorec, del svetlobe se pri tem absorbira, prepuščena svetloba pa pride do detektorja. Meje koncentracij raztopin za spektrofotometrijo so v področju med  $10^{-4}$  in  $10^{-5}$  M. (34) Spektrofotometrijo delimo na infrardečo spektrofotometrijo, pri kateri ne uporabljamo referenčne raztopine (ozadje), in na UV-vis (ultravijolično oz. vidno) spektrofotometrijo.

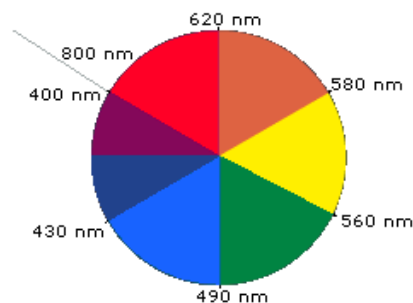
UV-vis spektrofotometrija je tehnika, ki omogoča oceno velikosti, koncentracije in agregacije nanodelcev. Čeprav vidimo sončno svetlobo (ali belo svetlobo) kot enotno/homogeno barvo, je dejansko sestavljena iz širokega razpona valovnih dolžin sevanja v ultravijoličnem (UV), vidnem in infrardečem.



Slika 9: Spekter vidne svetlobe

Vir: (45)

Ko pride bela svetloba v stik z barvno snovjo, se absorbira značilni del valovnih dolžin, valovne dolžine v preostalem delu spektra pa se od snovi odbijejo. Torej: snov, ki absorbira svetlobo z valovno dolžino 420-430 nm, je rumena, snov, ki absorbira pri 500-520 nm, pa je rdeča.



Slika 10: Barvni krog

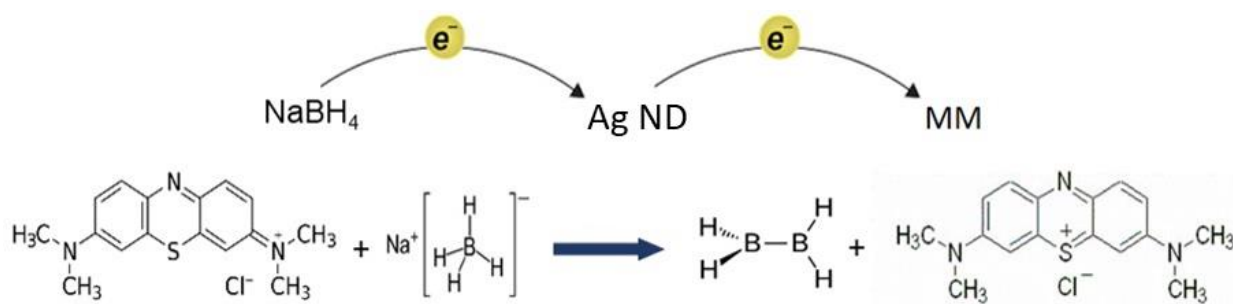
Vir: (43)

Med reakcijo pride do spremembe barve v UV-vis spektru produktov ki temelji na osnovi absorpcijskega zakona (Beer-Lambertov zakon). To je linearno razmerje med absorbanco in koncentracijo absorbirajoče zvrsti. Splošni Beer-Lambertov zakon se običajno piše kot:

$$A = \epsilon c l$$

kjer je  $A$  izmerjena absorbanca,  $\epsilon$  je ekstinkcijski koeficient absorpcije (enote:  $M^{-1} cm^{-1}$ ), ki je odvisen od valovne dolžine,  $l$  je dolžina poti in  $c$  je koncentracija komponente vzorec (analita). (34)

UV-vis spektrofotometer primerja delež svetlobe, ki preide skozi referenčno raztopino (ozadje) in skozi merjeni vzorec, v nekem času. Ta se lahko s potekom reakcije spremeni, saj nastanejo nove snovi. Za meritve je pomemben karakteristični vrh, ki predstavlja absorbanco svetlobe specifične valovne dolžine. Za srebrove nanodelce je 445 nm (44), za metilen modro je 665 nm (44). V našem primeru gre pri kolorimetrični detekciji za opazovanje spremembe barve, ki nastane zaradi reakcije med metilen modrim (MM) in natrijevim borohidridom ( $\text{NaBH}_4$ ). Kovinski nanodelci (Ag, Au ND) in nanodelci kovinskih oksidov ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ) zaradi svoje reaktivne površine v reakciji med MM in  $\text{NaBH}_4$  dobro delujejo kot katalizatorji. Gre za redoks reakcijo – prenos elektrona med reagentoma (slika 11). Oddajanje elektrona imenujemo oksidacija, sprejemanje pa redukcija. V tem primeru je zaradi svojega zelo nizkega standardnega potenciala reducent (tisti, ki odda elektron)  $\text{NaBH}_4$ , ki bo oddal elektron MM (oksidant). Ta se ob sprejetju elektrona razbarva (iz modre v brezbarvno). Vendar, ker je razlika med potencialoma  $\text{NaBH}_4$  (-1,33 V) in MM (-0,22 V) prevelika, reakcija prenosa elektrona sama po sebi poteka zelo počasi. Nanodelci v omenjeni reakciji delujejo kot katalizator in pospešijo oksidacijo MM. Njihov potencial se nahaja med potencialoma  $\text{NaBH}_4$  in MM, zato lahko služijo kot vmesna stopnja za elektron, ki tako namesto enega večjega skoka naredi dva manjša ter tako hitreje pripotuje do MM. Poleg reagentov in katalizatorja smo v raztopino morali dodati pufer, ki ohranja stabilen pH in s tem stabilen potencial MM (odvisen je od pH). (36) (16)



Slika 11: Shema redoks reakcije med  $\text{NaBH}_4$  in MM, kjer so srebrovi nanodelci katalizator

Vir: (42)

# 4 CILJI RAZISKAVE IN HIPOTEZA

Proizvajalci kupljenih dentalnih izdelkov trdijo, da so zaradi vsebnosti koloidnega ali nanosrebra (razlika je bila pojasnjena v prejšnjem poglavju, vendar zaradi poenostavljenega zapisa v tej nalogi uporabljamo oznako AgND = srebrovi nanodelci ali izraz nanosrebro) njihovi izdelki boljši od ostalih izdelkov na trgu. Močno izpostavljajo pozitivne antimikrobne učinke, o negativnih pa ne spregovorijo, čeprav mnoge zdravstvene institucije odsvetujejo uporabo nanodelcev in tudi konkretno nanosrebra. (6) Ker smo želeli objektivno ugotoviti, kakšni so ti izdelki v resnici, smo si v raziskavi zastavili štiri cilje:

1. s pomočjo strokovne oz. znanstvene literature ugotoviti dejanske lastnosti nanosrebra ter objektivno predstaviti tudi negativne učinke,
2. s pomočjo kolorimetrične detekcije, preproste in relativno poceni analizne metode, določiti, ali ti produkti (zobna ščetka, zobna krema in ustna vodica z nanodelci srebra) vsebujejo srebrove nanodelce,
3. preveriti, če je ta metoda ustrezna za vse tri tipe izdelkov z AgND, tako da vsebnost nanosrebra v vzorcih določimo še z drugimi metodami karakterizacije – SEM (vrstična elektronska mikroskopija) in EDS (energijska disperzijska spektroskopija),
4. za preverjanja ustreznosti metode kolorimetrične detekcije pripraviti referenčni vzorec, ki vsebuje srebrove nanodelce, in sicer želimo pripravo referenčnega vzorca izpeljati s pomočjo okolju prijazne metode (biosinteza srebrovih nanodelcev), da se izognemo uporabi prevelikemu številu nevarnih kemikalij, zapletenim sintezam in nevarnim stranskim produktom. V našem referenčnem vzorcu želimo tudi ugotoviti velikost AgND z metodo DLS (lasersko oz. dinamično sipanje svetlobe). Naša hipoteza je, da s krajšim časom priprave dobimo manjše srebrove nanodelce oz. z daljšim časom večje.

# 4. EKSPRERIMENTALNO DELO

Eksperimentalno delo smo razdelili na 2 dela. Prvi del je sinteza srebrovih nanodelcev iz ekstrakta bazilike, s katero smo pripravili že omenjeni referenčni vzorec. Drugi del eksperimentalnega dela zajema kolorimetrično detekcijo – metodo, ki smo uporabili za detekcijo prisotnosti srebrovih nanodelcev v dentalnih preparatih.

Vsi poskusi so bili opravljeni na Inštitutu Jožef Stefan (IJS), na Odseku za nanostrukturne materiale K7.

## 4.1 BIOSINTEZA SREBROVIH NANODELCEV (Ag ND)

### Materiali in kemikalije

- Bazilika
- Srebrov nitrat ( $\text{AgNO}_3$ )
- deionizirana voda

### Laboratorijski pripomočki in aparature

- tehtnica
- nož
- kuhinjska deska
- 250 mL čaše
- merilni valj
- merilna bučka
- magnetni mešalnik z grelcem in termočlenom
- filter papir (MN 640 w, 150 mm)
- lij
- centrifuga (5804, Eppendorf)
- plastične centrifugirke
- steklena paličica
- aluminijasta folija
- štoparica
- merilne pipete
- magnetno mešalo
- UV-vis spektrofotometer PerkinElmer Lambda 950 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, United States)
- plastične kivete
- pH meter (Kinck, Portamess)
- vrstični elektronski mikroskop (FEG-SEM, JEOL JSM 7600F, Tokyo, Japan)
- ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation)

### Postopki

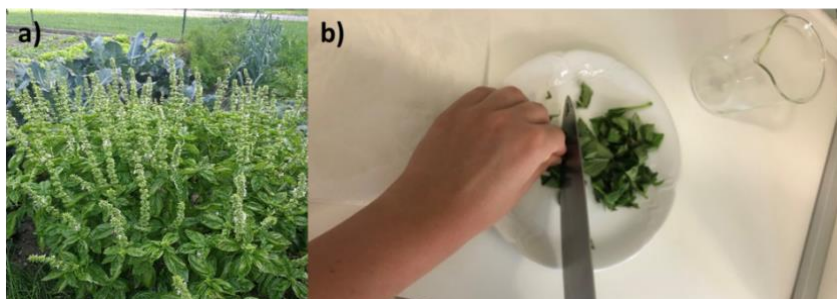
Ves postopek za sintezo Ag ND smo izvedli po navodilih članka: »Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Ocimum basilicum*« (27).

### Priprava ekstrakta

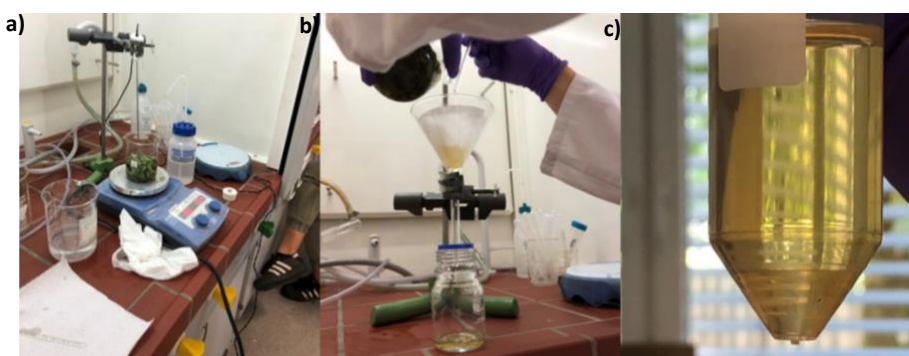
Najprej smo pripravili ekstrakt bazilike. Liste bazilike (slika 12), nabrane na vrtu, smo v laboratoriju umili z deionizirano vodo. Umite liste smo osušili, odtehtali 10 g, jih nasekljali, dali v 250 mL čašo in dolili 100 mL



deionizirane vode. Vse skupaj smo pomešali s stekleno paličico, tako da so bili vsi nasekljani listi bazilike potopljeni v vodo. Mešanico smo postavili na grelec in dodali termočlen (za ohranjanje konstantne temperature) ter segreli na 100°C. Ko je zavrelo, smo temperaturo spustili na 80°C in jo vzdrževali 5 min. Nato smo ohladili na sobno temperaturo in filtrirali v drugo čašo. Pripravljen ekstrakt smo 10 min centrifugirali na 10.000 rpm in supernatant shranili v hladilnik (na 4°C) za kasnejše eksperimente.



Slika 12: Bazilika z vrta

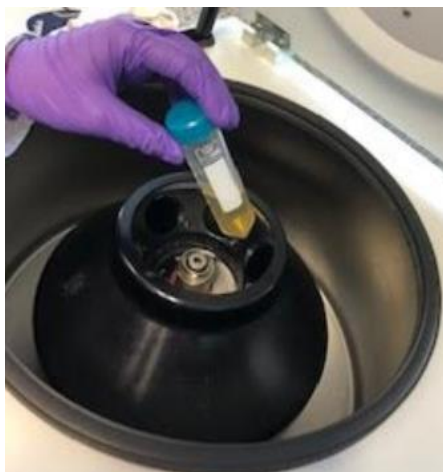


Slika 13: Priprava ekstrakta: kuhanje bazilike (a), filtriranje (b) in končni produkt (c)

## Sinteza Ag ND in opazovanje njihovega nastanka

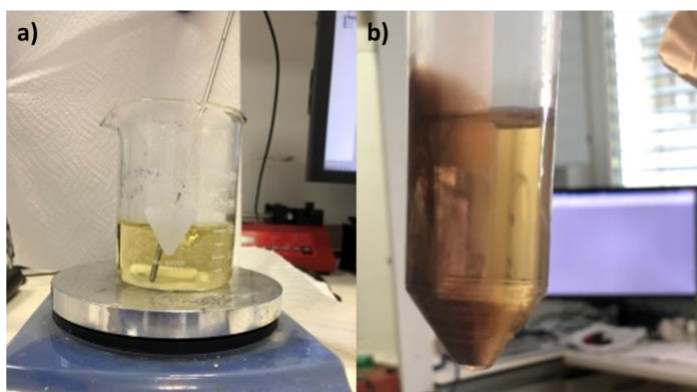
Za sintezo Ag ND smo pripravili 100 ml 1 mM raztopine srebrovega nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ; zatehtali smo 16,987 mg  $\text{AgNO}_3$  v 100 mL merilno bučko). Pred izvedbo sinteze smo izmerili absorbanco posameznih uporabljenih reagentov ( $\text{AgNO}_3$  in ekstrakt bazilike). Reagente smo razredčili z vodo na enake koncentracije, kot smo kasneje uporabili za samo sintezo (koncentracije v čaši).  $\text{AgNO}_3$  smo redčili 1,05x (2,857 mL 1 mM  $\text{AgNO}_3$  + 0,143 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ), ekstrakt bazilike pa 20x (0,15 mL ekstrakta + 2,85 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Za sintezo smo v čaši z magnetnim mešalom segreli 95 ml raztopine  $\text{AgNO}_3$  na 80 °C za 5 min ter nato dodali 5 ml ekstrakta bazilike (priprava opisana v prejšnjem poglavju). Takoj po dodatku ekstrakta v čašo smo začeli meriti čas in opazovali dogajanje. Dogajanje oz. potek sinteze smo spremljali s fotografiranjem in merjenjem absorbance. Iz čaše smo v času 1, 2, 3, 4, 5, 7 in 8 min po dodatku ekstrakta s kapalko odvzeli nekaj ml (da smo napolnili kiveto do polovice) suspenzije in jo dali v plastično kiveto ter izmerili absorbanco. Sintezo smo pustili teči 8 min, nato pa smo vzorec 15 min centrifugirali (5804, Eppendorf) na 10000 rpm, supernatant prelili in ga shranili za nadaljnje analize.



Slika 14: Centrifugiranje sintetiziranih nanodelcev

Vse meritve absorbance smo izvedli z uporabo spektrofotometra s 150 mm spektrom (PerkinElmer Lambda 950 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, United States)). Merili smo v območju med 300 nm do 600 nm valovne dolžine svetlobe.



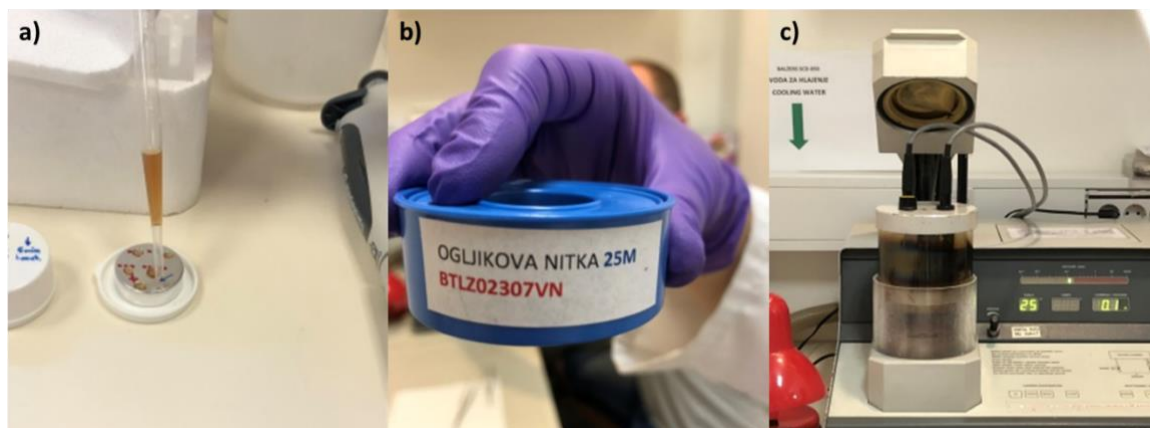
Slika 15: Sintetizirani nanodelci pred centrifugiranjem (a) in po centrifugiranju (b)

## Karakterizacija sintetiziranih srebrnih nanodelcev

Nanodelce smo karakterizirali z različnimi načini:

- Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) in energijska disperzijska spektroskopija (EDS)

Med potekom sinteze delcev smo določen čas trajanja sinteze (1, 2, 3, 4, 5 in 7 min) na nosilec za SEM nanesli kapljico vzorca. Po končani sintezi smo dodali še kapljico supernatanta (končani centrifugirani delci), ter pustili da se kapljice posušijo. Pred analizami smo na nosilec napršili ogljik, da je vzorec tako prevajal elektriko. SEM analize smo naredili na vrstičnem elektronskem mikroskopu (FEG-SEM, JEOL JSM 7600F, Tokyo, Japan), opremljenim z energijskim disperzijskim rentgenskim spektrometrom (EDX), na Institutu »Jožef Stefan«.



Slika 16: Nosilec s kapljicami sintetiziranega srebra v različnih minutah (a) in presublimacija ogljikove nitke (b in c) na le-tega

- Merjenje zeta potenciala in pH

Za merjenje zeta potenciala smo uporabili napravo ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation) na Institutu »Jožef Stefan«.

S pH metrom (Kinck, Portamess) smo na Institutu »Jožef Stefan« izmerili pH, ki je eden izmed parametrov za zeta potencial.

- Merjenje velikosti delcev s pomočjo dinamičnega sipanja svetlobe (DLS)

Meritve smo naredili z uporabo opcije Multi Angle Particle Size (90Plus/BI-MAS) na Brookhaven Instruments Corporation ZetaPALS, ki temelji na dinamičnem razprševanju svetlobe, na Institutu »Jožef Stefan«.

## 4.2 KOLORIMETRIČNA DETEKCIJA NANOSREBRA V DENTALNIH PRODUKTIH

### Opis dentalnih produktov

- **Zobna ščetka – Doctor Plotka's mouthwashers**

(Proizvajalec: DOCTOR PLOTKA'S)

- **Ustna vodica**

(Proizvajalec: SILVER BOTANICALS)

Sestavine: destilirana voda, natrijev bikarbonat, ksilitol, eterična olja (cimet, poprova meta, rožmarin, limona, mira, timijan, nageljnovе žbice, evkaliptus) ksantan gumi, ekstrakt grenivkinih pečk, sončnični lecitin, nanosrebro



Slika 17: Dentalni produkti

- **Zobna pasta**

(Proizvajalec: DENTAVIT)

Sestavine: kalcijev karbonat, voda, sorbitol, PEG-8, glicerin, hidriran silicijev dioksid, natrijev dodecilsulfat, celulozna guma, natrijev monofluorofosfa, aroma, metilparaben, natrijev saharin, benzil alkohol, limonen, koloidno srebro, briljantno modro FCF, kinolin rumeno

### Materiali in kemikalije

- umetna slina (cca. 20 mL)
- deonizirana voda
- 4-(2-hidroksietil)pipericin-1-etan sulfonska kislina (HEPES)
- metilen modro (MM)
- natrijev borohidrid ( $\text{NaBH}_4$ )

### Pripomočki

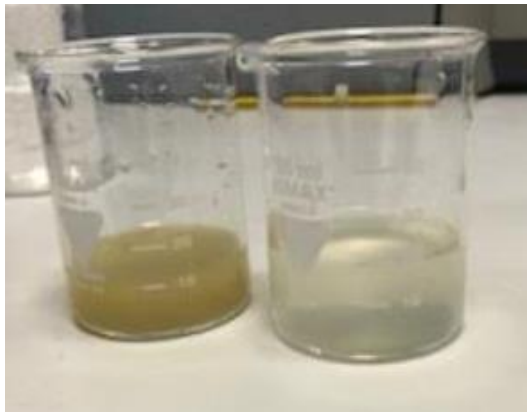
- magnetno mešalo
- magnetni mešalnik
- štoparica
- 50 mL merilne čaše
- steklene palčice
- merilne pipete
- deionizirana voda
- gumijaste rokavice
- kivete
- aluminijasta folija
- UV-vis spektrofotometer PerkinElmer Lambda 950 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, United States)
- vrstični elektronski mikroskop (FEG-SEM, JEOL JSM 7600F, Tokyo, Japan)
- Ultrazvočna kopel (Iskra pio, Sonis 4) pri sobni temperaturi
- ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation)

# Postopki

## Priprava vzorcev

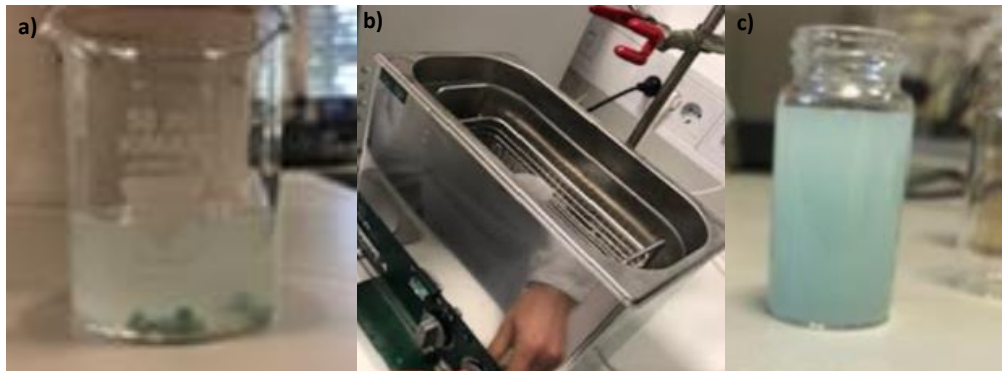
### USTNA VODICA

Ustno vodico smo najprej 20-krat razredčili z deionizirano vodo, saj je bila na začetku pretemna za UV-vis spektrofotometrijo. Nato smo jo dali v ultrazvočno kopel za 3 minute, zato da bodo delci homogeno razporejeni v suspenziji.



Slika 18: Nerazredčena ustna vodica (levo) in razredčena ustna vodica (desno)

### ZOBNA PASTA



Slika 19: Nerazredčena ustna vodica (levo) in razredčena ustna vodica (desno)

0,6 g zobne paste smo dali v čašo z 20 mL deionizirane vode ter dali v ultrazvočno kopel za 3 minute.

### ZOBNA ŠČETKA

Odločili smo se, da bomo en vzorec zobne ščetke namakali v vodovodni vodi, saj v vsakdanjem življenju z njo spiramo zobno ščetko, in v umetni slini, da smo simulirali pogoje v ustih, kjer je pH kisel. Namakali smo ju od 18. 7. 2018 do 9. 8. 2018 v 10 mL.

Za pripravo raztopine umetne slini smo sledili receptu Fusayamna in Mayer. Za liter raztopine v ultra čisti vodi smo uporabili:

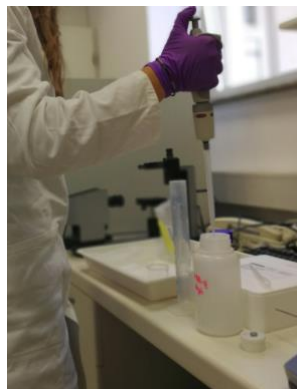
- KCl (0,4 g/L)
- NaCl (0,4 g/L)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,906 g/L)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,531 g/L)
- Sečnino (1 g/L) (35)



Slika 20: Zobna ščetka v umetni slini (levo) in vodovodni vodi (desno)

## Kolorimetrična detekcija

Postopek kolorimetrične detekcije smo povzeli po članku: »Colometric detection of Catalytic Reactivity of Nanoparticles in Complex Matrices« (40). Najprej smo pripravili potrebne kemikalije: HEPES pufer (v 10 mL deionizirane vode smo dali 0,238 g),  $\text{NaBH}_4$  (v 5 mL deionizirane vode smo dali 6,39 mg) ter metilen modro (MM; v 20 mL deionizirane vode smo dali 6,39 mg) in ga ovili v aluminijasto folijo, saj je občutljiv na svetlobo.



Slika 21: Pipetiranje vzorcev za kolorimetrično detekcijo

Za izvajanje kolorimetrične detekcije smo pripravili delovno suspenzijo: 2140 mL vzorca nanodelcev, 260 ml HEPES (10 mM koncentracija), 100 ml  $\text{NaBH}_4$  (10 mM končna koncentracija), 100 ml MM (40  $\mu\text{M}$  končna koncentracija) v plastični kiveti in med tem neprestano mešali z magnetnim mešalom. Ob dodatku vsake kemikalije smo mešali določen čas: 2 min pri dodatku HEPESA vzorcu in 4 min pri dodatku

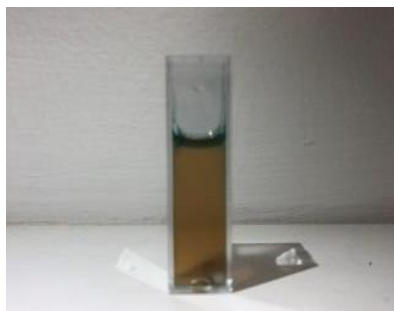
NaBH<sub>4</sub>. Ob dodatku MM smo počakali nekaj sekund, da se je ta enakomerno porazdelil in takoj izmerili absorbanco. Absorbanco smo merili z uporabo spektrofotometra s 150 mm spektrom (PerkinElmer Lambda 950 UV/Vis/NIR (Perkin Elmer, United States). Merili smo v območju med 750 nm do 550 nm valovne dolžine svetlobe. Meritve smo izvajali v določenih časovnih obdobjih, merjenih po dodatku MM v kiveto. Za ozadje pred vsako meritvijo smo uporabili deionizirano vodo. Le v primeru vzorca zobne ščetke, ki je bila namočena v umetni slini, smo kot ozadje uporabili umetno slino.

### **Slepa proba**

Najprej smo namesto vzorca nanodelcev uporabili vodo in petkrat zapored izmerili absorbanco MM v času 0. Da smo pridobili dokaz o predvidenem počasnem poteku reakcije, smo eksperiment z vodo opazovali v določenem časovnem razmiku 1 uro. Postopek smo ponovili z umetno slino.

### **Referenčni vzorec - sintetizirani nanodelci**

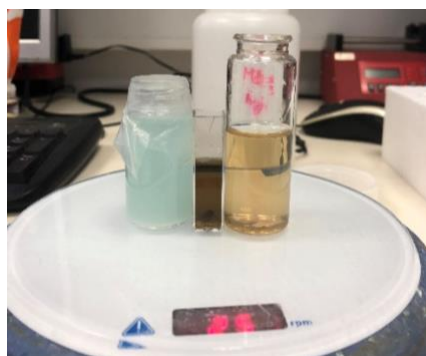
Sintetizirane nanodelce smo uporabili kot referenčni vzorec za verifikacijo kolorimetrične metode. Izvedba kolorimetrične detekcije za te vzorce je opisana v prejšnjem poglavju (Biosinteza srebrnih nanodelcev; Karakterizacija; UV-vis spektrofotometrija). Ker je reakcija zaradi previsoke koncentracije delcev potekla prehitro, da bi lahko natančno analizirali spremembo, smo jo ponovili s 15-krat razredčenim vzorcem.



*Slika 22: Kiveta z metilen modrim v sintetiziranih nanodelcih*

### **Kolorimetrična detekcija (nano)srebra v dentalnih vzorcih**

Postopek izvedbe meritev je bil enak, kot je opisan zgoraj. Kot vzorec smo uporabili zgoraj opisane pripravljene dentalne produkte.



*Slika 23: Priprava vzorca z zobno pasto*

## Karakterizacija dentalnih izdelkov

Nanodelce v dentalnih produktih smo karakterizirali z različnimi metodami: z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), z dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS).

- **Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) in energijska disperzijska spektroskopija (EDS)**

Na nosilec smo nanесли ščetini zobnih ščetk (nalepili na ogljikov lepilni trak), kapljico vzorca umetne slin ter vode, v kateri smo namakali ščetki, kapljico raztopine zobne paste ter ustne vodice. Pred analizami smo na nosilec napršili ogljik, da je vzorec tako prevajal elektriko. SEM analize smo opravili na vrstičnem elektronskem mikroskopu (FEG-SEM, JEOL JSM7600F, Tokyo, Japan), opremljenim z energijskim disperzijskim rentgenskim spektrometrom (EDS), na Institutu »Jožef Stefan«.



*Slika 24: Nosilec z vzorci dentalnih produktov*

- **Merjenje pH**

S pH metrom (Kinck, Portamess na Institutu »Jožef Stefan«) smo izmerili pH, ki je eden od ključnih parametrov za zeta potencial.

- **Merjenje velikosti delcev**

Meritve smo naredili z uporabo opcije Multi Angle Particle Size (90Plus/BI-MAS) na Brookhaven Instruments Corporation ZetaPALS, ki temelji na dinamičnem razprševanju svetlobe, na Institutu »Jožef Stefan«. Za merjenje velikosti Ag delcev smo uporabili lomni količnik srebra: 1,33.

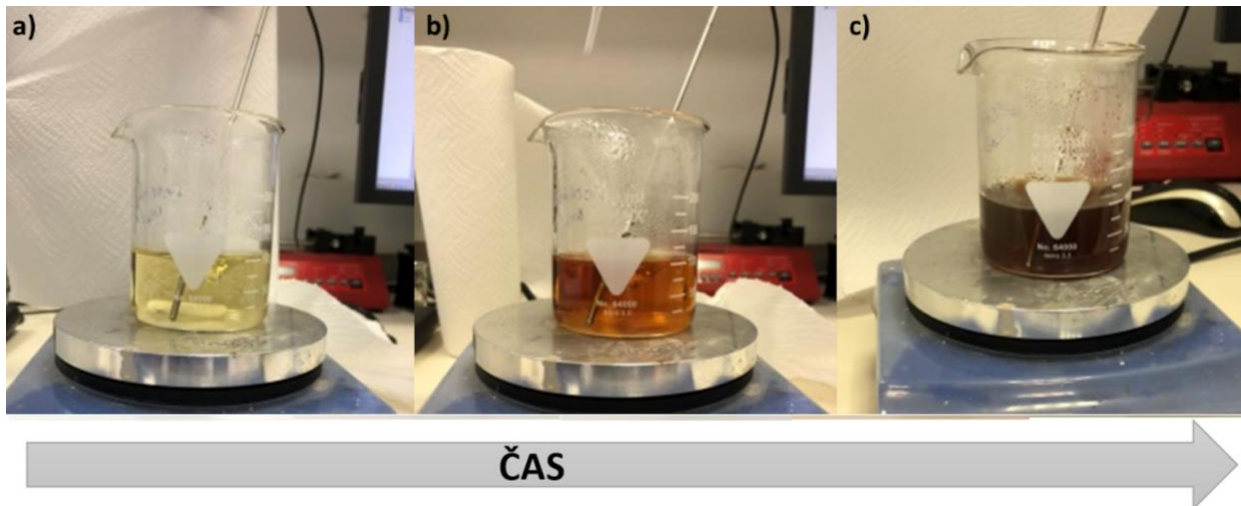


# 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

## 5.1 BIOSINTEZA

### 5.1.1 Sinteza in spremljanje nastajanja

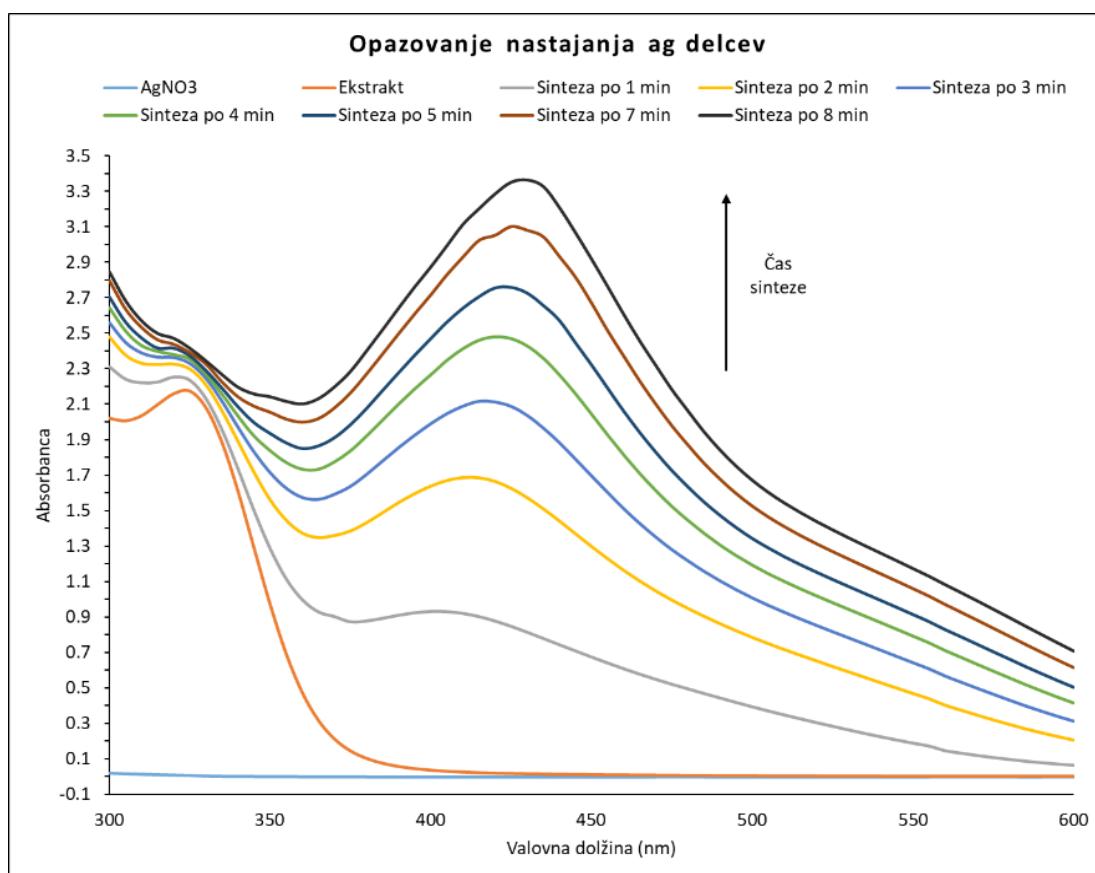
Slika 25 predstavlja potek sinteze Ag ND iz ekstrakta bazilike in srebrovega nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ).



*Slika 25: Sprememba barve zaradi nastanka srebrvih nanodelcev. Ekstrakt bazilike (a) se iz svetlo rumene barve ob dodatku  $\text{AgNO}_3$  (b) obarva svetlo rjavo. Po koncu sinteze (c) je vsebina čaše temno rjava.*

Na sliki 25a vidimo čašo z ekstraktom bazilike. Nato smo mu dodali  $\text{AgNO}_3$  (slika 25b). Že po nekaj sekundah smo opazili spremembo barve (iz svetlo rumene v temno rjavo). Zaradi očitne vizualne spremembe zmesi lahko sklepamo, da je potekla kemijska reakcija (kar je bilo pričakovano glede na članek: Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *thrysiflorum* (34)).

Graf na sliki 26 predstavlja absorbanco reagentov (ekstrakt bazilike in  $\text{AgNO}_3$ ) in nastalih produktov v različnem času po dodatku  $\text{AgNO}_3$ , ki smo jo opazovali z UV-vis spektrofotometrom v spektru med 300 in 600 nm.



Slika 26: Absorbanca reagentov (svetlo modra -  $\text{AgNO}_3$  in oranžna - ekstrakt bazilike) za sintezo in spremljanje poteka sinteze ter nastajanja Ag ND v časovnem obdobju, merjenem po dodatku ekstrakta

Ekstrakt ima zaradi svoje barve, ki smo jo lahko tudi s prostim očesom opazili, že nek karakteristični vrh v opazovanem spektru (pri valovni dolžini 300 nm do 330 nm; oranžna krivulja na grafu 26), a ne moti opazovanja, saj ni na enaki valovni dolžini kot karakteristični vrh za srebro, ki je na valovni dolžini od 436 do 445 nm (33) (48). Iz grafa je razvidno, da  $\text{AgNO}_3$  ne absorbira svetlobe v opazovanem spektru valovne dolžine (svetlo modra krivulja na grafu 26).

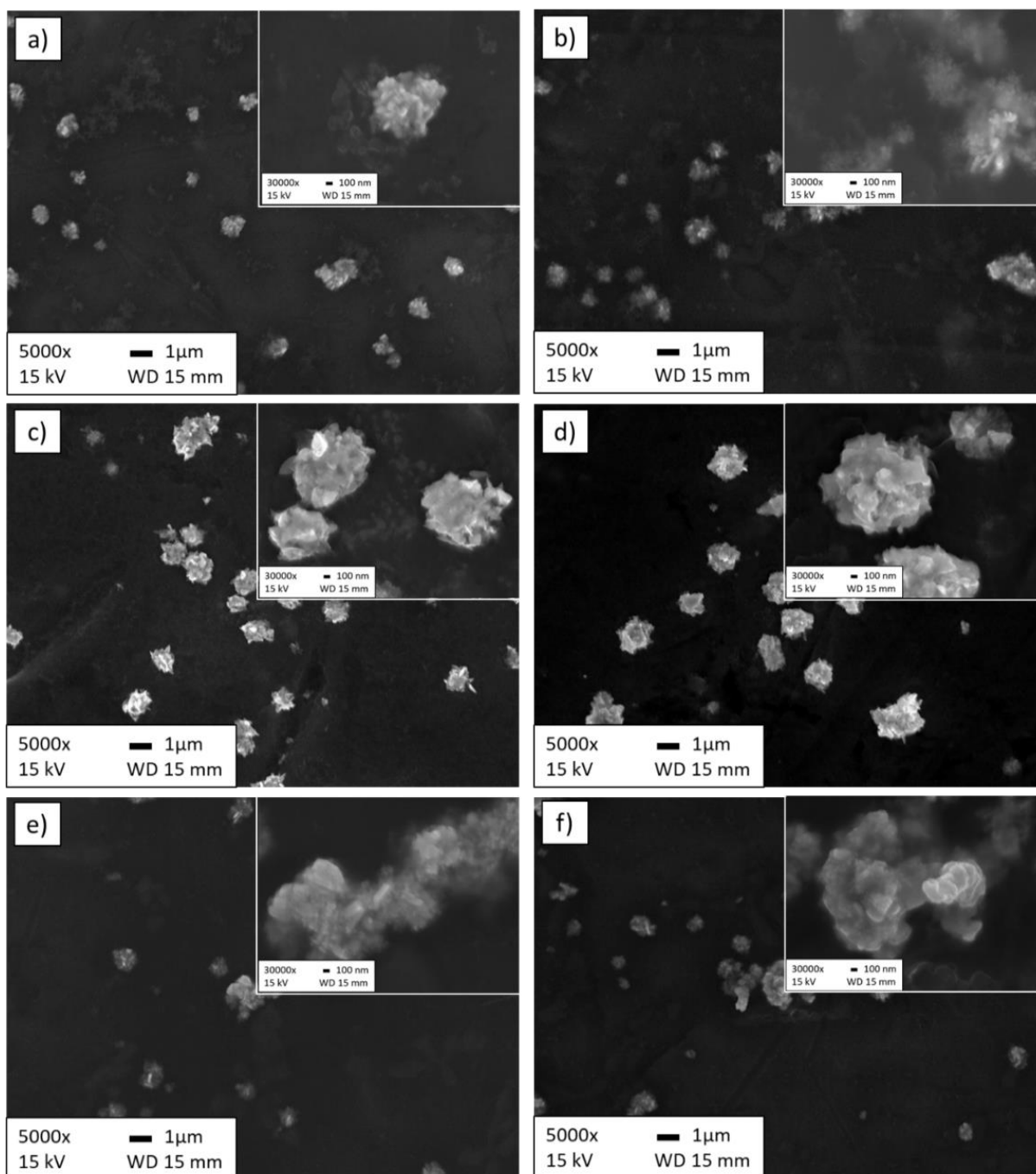
1 minuto po dodatku  $\text{AgNO}_3$  v ekstrakt bazilike že opazimo absorbanco pri 445 nm (siva krivulja na grafu 26). Ta se z vsako minuto povečuje. Po končani reakciji vidimo izrazit karakteristični vrh, s čimer potrdimo nastanek srebra (temno siva krivulja na grafu 26). Hitrost reakcije pojenja, saj se absorbanca v prvi minuti spreminja hitreje kot v osmi minuti (primerjava svetlosive in temnosive krivulje na grafu 26).

Domnevamo, da je to posledica porabe limitnega reagenta ( $\text{AgNO}_3$ ).

## 5.1.2 Karakterizacija sintetiziranih nanodelcev

Po končani sintezi (ki je trajala 8 min), smo nastalo snov karakterizirali z različnimi metodami (elektronska vrstična mikroskopija (SEM), dinamično sipanje svetlobe (DLS), da bi dokazali prisotnost srebra oz. prisotnost srebrovih nanodelcev.

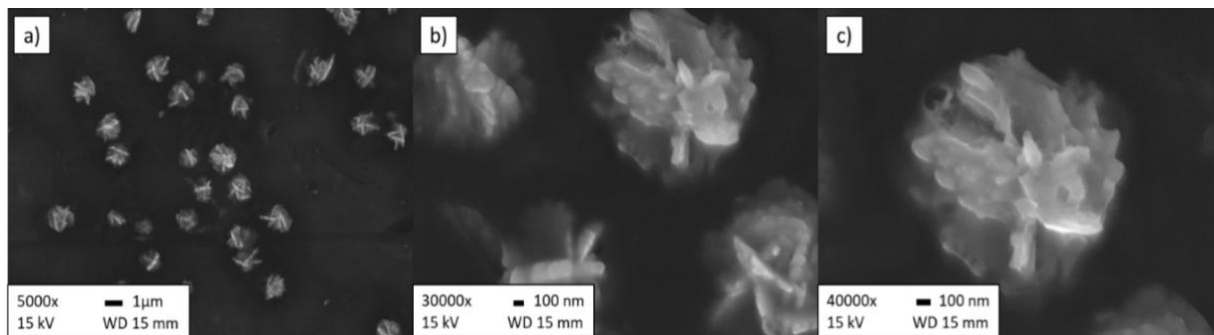
Slika 27 prikazuje SEM slike produktov zgoraj opisane sinteze. Vzorci smo vzeli v različnem času trajanja sinteze (1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 7 min po dodatku  $\text{AgNO}_3$ ).



Slika 27: Mikroskopske slike sintetiziranih delcev (dve povečavi, 5000x in 30000x) med nastajanjem: 1 min (a), 2 min (b), 3 min (c), 4 min (d), 5 min (e), in 7 min (f) od dodatka  $\text{AgNO}_3$

Na sliki opazimo svetle delce in nekaj manjših temnejših skupkov. Ti so lahko posledica še ne popolnoma nastalih delcev (še v fazi rasti). Nastali delci so nepravilnih oblik in imajo razgibano površino, kar je lahko posledica prisotnosti organskih molekul iz sinteze. To se ujema s samo pripravo delcev, saj smo za sintezo srebrovih nanodelcev uporabili rastlinski ekstrakt. Večina nastalih delcev je večja od 100 nm praktično že od začetka sinteze (slika 27a) in s časom še bolj rastejo ter jih je vedno več (na sliki 27c so že vidno večji kot na sliki 27a). Natančno velikost sintetiziranih delcev lahko potrdimo šele v nadaljevanju z dinamičnim sipanjem svetlobe, saj smo za SEM analize delce posušili, kar je lahko povzročilo dodatno aglomeracijo med njimi (nastanek večjih delcev). V prvi minuti (slika 27a) so delci bolj okrogli, vseeno pa vidimo neravno površino in izrastke, ki so s časom še bolj izraziti (prisotnost ostankov iz ekstrakta). Ob koncu sinteze (sliki 27e in 27f) so tako razvejani, da lahko skoraj zagotovo sklepamo, da gre za aglomerate. Okoli njih vidimo meglene in temnejše lise, katere lahko predstavljajo ostanek organskih snovi, znotraj katerih so delci nastali in s tekom reakcije so te molekule povezale nastajajoče delce v aglomerate. Na združevanje je najverjetneje vplivalo tudi hlapenje kapljice tekočine, v kateri se je vzorec nahajal.

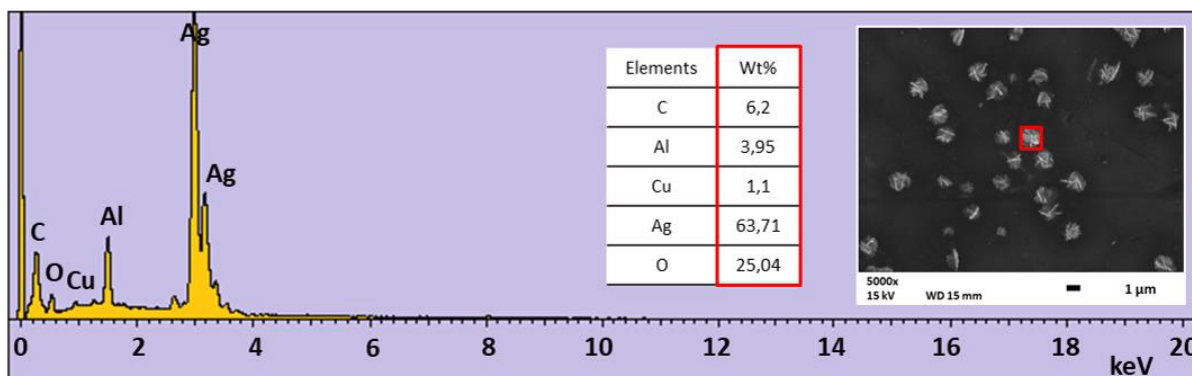
Po končani sintezi smo produkte sinteze centrifugirali, da smo se znebili velikih bioloških molekul, ki jih je vseboval ekstrakt. Slika 28 prikazuje SEM slike centrifugiranih produktov – končnih sintetiziranih delcev.



Slika 28: Mikroskopska slika končnih delcev pri različnih povečavah: 5000x (a), 30000x (b), 40000 (c)

V primerjavi z delci pred centrifugiranjem (slika 27f), so tisti po centrifugiranju (slika 28) bistveno manj razvejani, bolj razporejeni in »pravilnejših« oblik. Pod manjšo povečavo izgledajo okrogli (slika 28a), a pod večjo povečavo (slika 28c) vidimo, da je tudi površina centrifugiranih delcev nekoliko razgibana. Predpostavimo, da gre za aglomerate, podobne tistim, ki smo jih opazovali že na sliki 27f, le da ti niso »oviti« v organsko snov. Če bi vzorec pustili še nekaj časa, bi zaradi prisotnosti organske snovi verjetno nastalo več aglomeratov.

Slika 29 prikazuje elementarno sestavo končnih sintetiziranih delcev z metodo EDS (energijska disperzijska spektroskopija).



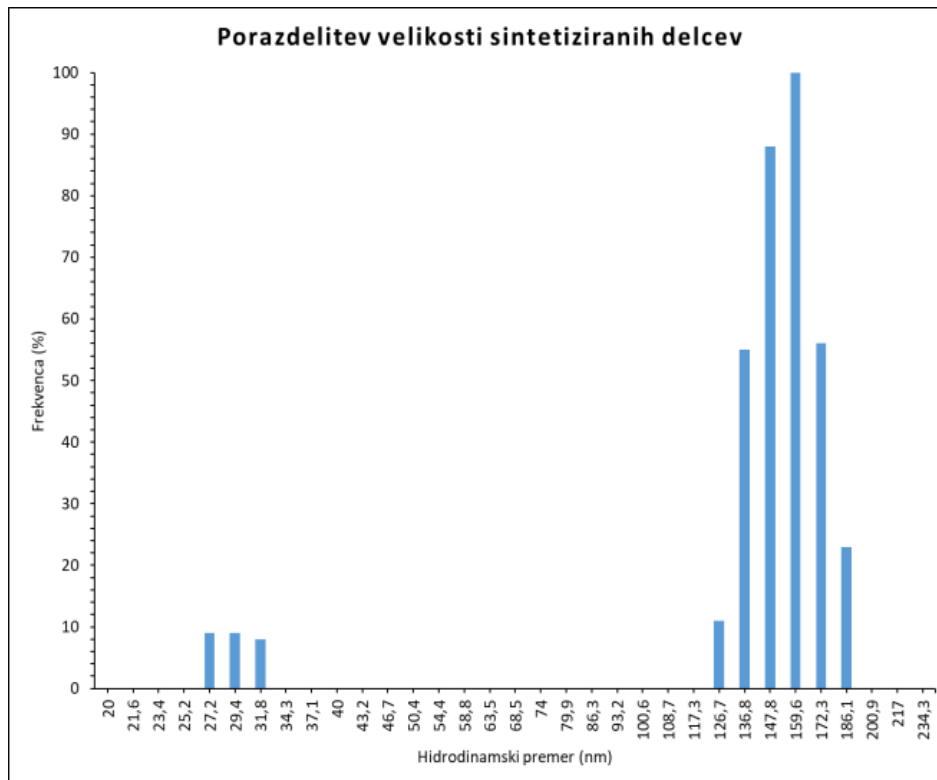
Slika 29: Elementarna sestava končnih sintetiziranih delcev (EDS)

S to metodo smo lahko natančno določili elementarno sestavo delcev. Glede na to, da je srebro prevladujoči element (predstavlja 63,71% vzorca), lahko potrdimo, da so nastali srebrovi delci, kakor je bilo pričakovano. Vendar poleg srebra najdemo tudi druge elemente. Ogljik in kisik pogosto sestavljata organske snovi, zato sklepamo, da sta na delcih oz. v vzorcu prisotna kot ostanek ekstrakta bazilike, ki ga s centrifugiranjem nismo mogli dokončno odstraniti. Prisotnost ogljika je bila pričakovana tudi zaradi predhodne napržitve vzorca z grafitom. Zaznali smo tudi približno 5% aluminija in bakra. Predpostavljamo, da sta prisotna zaradi kontaminacije vzorca med samo sintezo.

Tabela 1 prikazuje rezultate merjenja velikosti delcev z dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS) pri določenem pH končnih produktov sinteze. Slika 30 predstavlja porazdelitev velikosti končnih sintetiziranih delcev, izmerjene z DLS.

Tabela 1: Rezultati merjenja velikosti delcev in zeta potenciala končnih sintetiziranih delcev

pH	Hidrodinamski premer (nm)	Polidisperzni indeks	Povprečje (nm) »Mean«	Sredina (nm) »Mediana«
4,35	138,2 ± 5,3 nm	0,355	158,1 nm	139,4 nm



Slika 30: Porazdelitev velikosti končnih sintetiziranih delcev

DLS analiza je pokazala, da je hidrodinamski premer srebrnih delcev pri pH 4,35 približno 140 nm (tabela 1). Ker ta vključuje tudi hidratacijski ovoj, lahko potrdimo da nastali delci ustrezajo definiciji nanodelca. Vendar so vseeno za skoraj 100 nm večji od tistih, ki so jih sintetizirali indijski znanstveniki in njihovo raziskavo zabeležili v članku, po katerem smo izvedli sintezo (Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *thrysiflorum* (33)). Vzrok za takšno razliko je čas trajanja sinteze (mi smo delce pustili rasti 8 min, oni pa 5 min), dopustiti pa moramo tudi možnost, da je lahko v sintezi in pripravi ekstrakta prišlo do odstopanj.

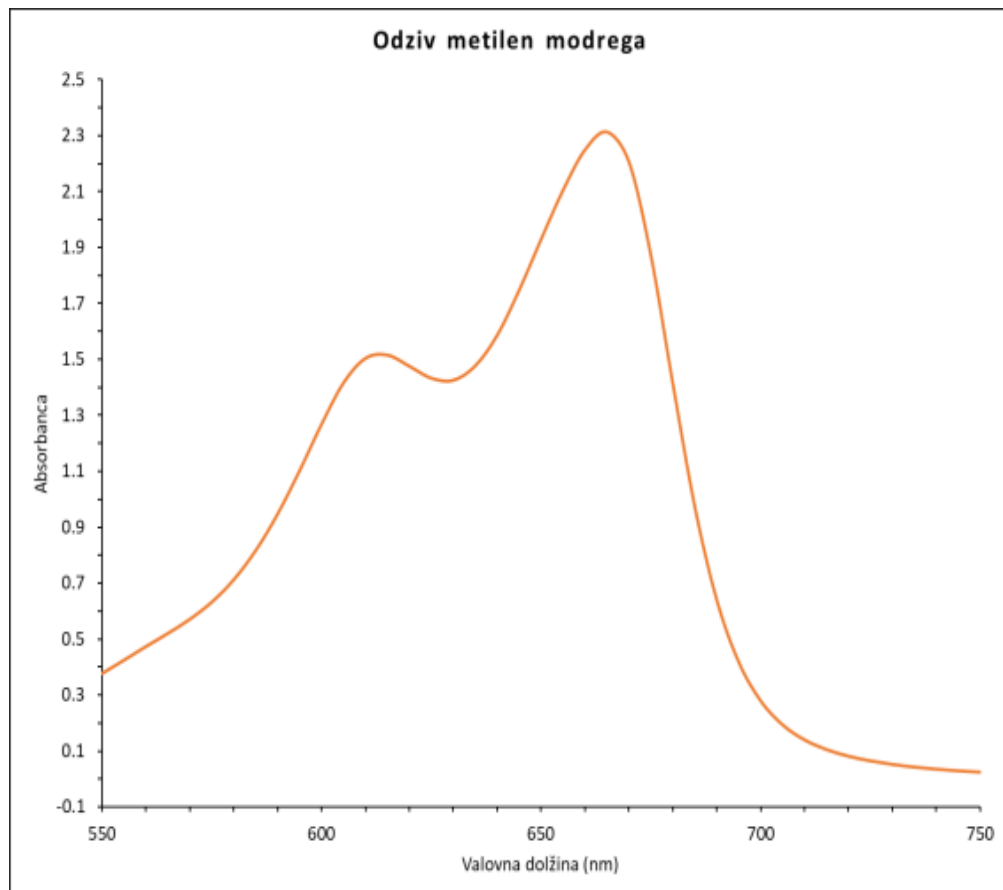
Iz grafa na sliki 30 razberemo, da je porazdelitev nastalih delcev po velikosti ozka, kar nam potrди tudi polidisperzni indeks, ki meri 0,355 (tabela 1). Poleg tega je razvidno, da imamo 2 populaciji delcev; torej je razporeditev bimodalna. Večjo populacijo sestavljajo od 126,7 do 186,1 nm veliki delci (s hidrodinamskim ovojem), manjšo pa manjši delci (veliki od 27,2 do 31,8 nm). Možnih razlag za nastanek dveh populacij je več. Glede na to, da so nastali aglomerati, lahko manjšo populacijo sestavljajo fragmenti razpadlega aglomerata. Možnost pa je tudi, da so ti delci kasneje začeli nastajati oz. se je med nastajanjem njihova rast ustavila. Razlog pa je lahko tudi rast delcev na račun drugih (manjših).

## 5.2 KOLORIMETRIČNA DETEKCIJA DENTALNIH PRODUKTOV

### 5.2.1 Preverjanje metode

#### 5.2.1.1 Slepa proba

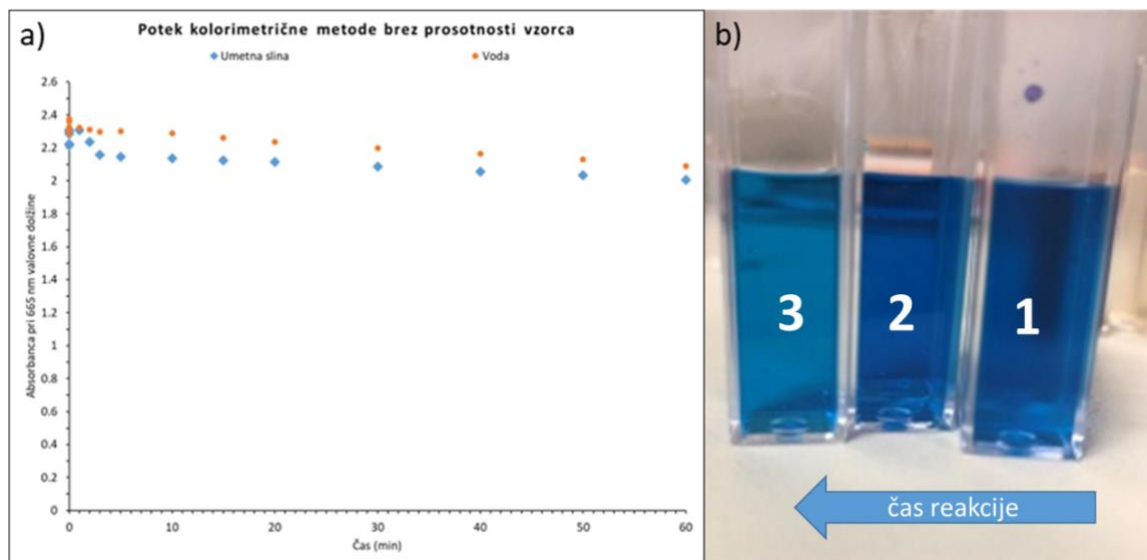
Slika 31 prikazuje absorbanco barvila metilen modro (MM) brez prisotnosti vzorca v času 0.



Slika 31: Absorbanca barvila metilen modro v času 0 brez prisotnosti vzorca

Absorbanco MM smo opazovali z UV-visom v spektru med 550 nm in 750 nm. Ugotovili smo, da ima metilen modro dva karakteristična vrha. Mi smo se osredotočili na drugega (višjega), ki je na valovni dolžini 665 nm, kar navajajo tudi viri (40).

Slika 32 prikazuje potek reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom ( $\text{NaBH}_4$ ) brez prisotnosti srebrvih nanodelcev v vodi ter umetni slini v eni uri.



Slika 32: a) Opazovanje poteka kolorimetrične metode brez prisotnosti delcev (modra: umetna slina kot vzorec; oranžna: voda kot vzorec) in b) slika MM v času 0 (1) in po določenem času poteka eksperimenta (2, 3)

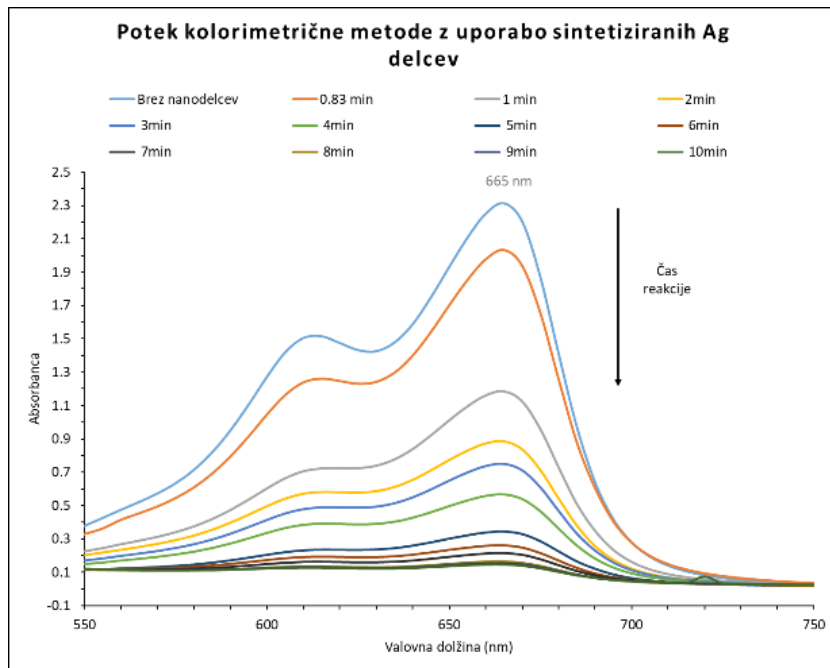
Vidimo, da reakcija poteka zelo počasi, kar se ujema s teorijo o redoks reakciji med MM in  $\text{NaBH}_4$ . Kljub temu, da smo reakcijo opazovali eno uro, je razlika v absorbanci minimalna in komaj zaznavna s prostim očesom (slika 32b), kar pomeni, da se je MM le malo razbarval. V umetni slini v prvih minutah sinteze opazimo hitrejšo razliko absorbanca MM, a se nato upočasni. Razlog za hitrejšo spremembo bi lahko bil pH, prisotnost soli v umetni slini, lahko pa da gre le za napako v pipetiranju.

#### 5.2.1.2 Referenčni vzorec

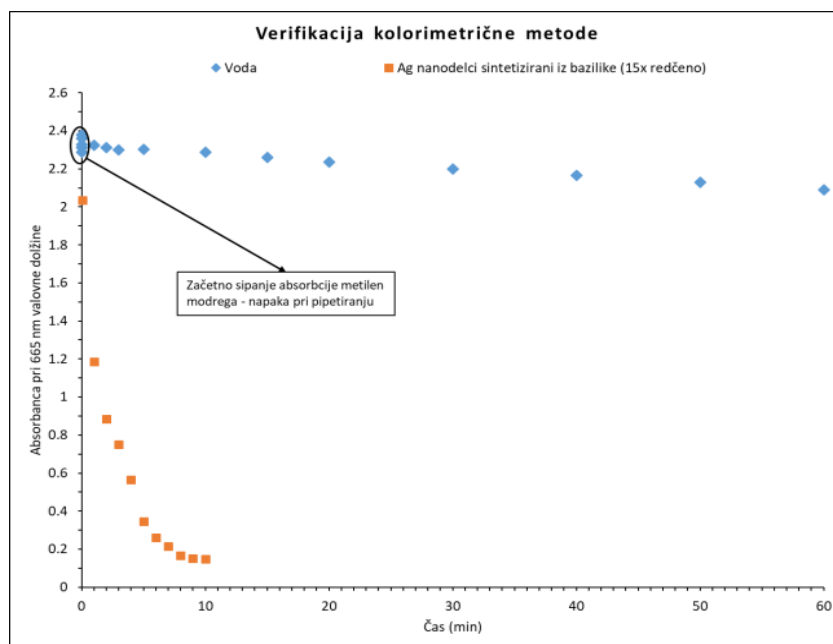
Slika 33 prikazuje MM v reakciji z  $\text{NaBH}_4$  ob prisotnosti sintetiziranih srebrvih nanodelcev (Ag ND), ki smo jih uporabili kot referenčni vzorec, s katerim smo preverili delovanje metode (kolorimetrična detekcija). Reakcijo smo opazovali z UV-vis spektrofotometrom v spektru med 550 nm in 750 nm.

Slika 34 prikazuje primerjavo absorbanca MM ob in brez prisotnosti Ag ND v vodi.





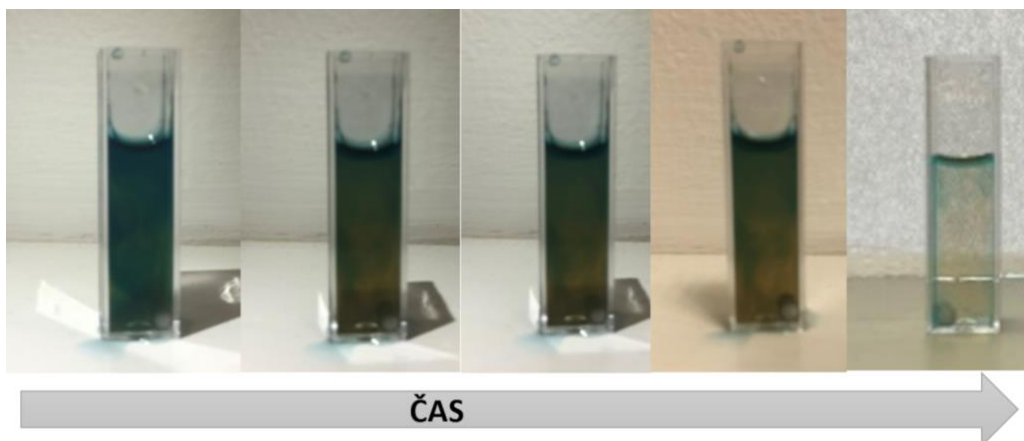
Slika 33: Spremljanje kolorimetrične metode (reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom) z uporabo sintetiziranih Ag ND



Slika 34: Verifikacija kolorimetrične metode. Primerjava poteka reakcije v primeru prisotnosti Ag nanodelcev (oranžna) oz. brez nanodelcev (modra)

Na sliki 33 in 34 vidimo, da se absorbanca MM (vrh pri 665 nm) že po slabi sekundi zmanjša, kar je dokaz o hitrem razbarvanju MM. Nato pa hitrost reakcije pojenja. Po desetih minutah se MM razbarva, kar dokazuje, da so srebrovi nanodelci katalizator izvedene reakcije. Če razbarvanje MM ob prisotnosti vzorca primerjamo z razbarvanjem MM v vodi (Slika 34) lahko opazimo občutno razliko, ki se sklada s teorijo (44). Razlika v hitrosti reakcije nam potrди, da Ag ND delujejo kot katalizator (pospešijo reakcijo) v omenjenem sistemu.

Slika 35 prikazuje razbarvanje MM ob prisotnosti referenčnega vzorca (srebrovih nanodelcev).



Slika 35: Razbarvanje metilen modrega ob prisotnosti referenčnega vzorca

Na sliki 35 je sprememba barve vizualno očitna. Modra barva se razbarva, ker se MM hitreje in lažje reducira ob prisotnosti Ag ND. Na vrhu modra barva ostane, saj je kisik dober oksidant in oksidira razbarvani MM do modre barve.

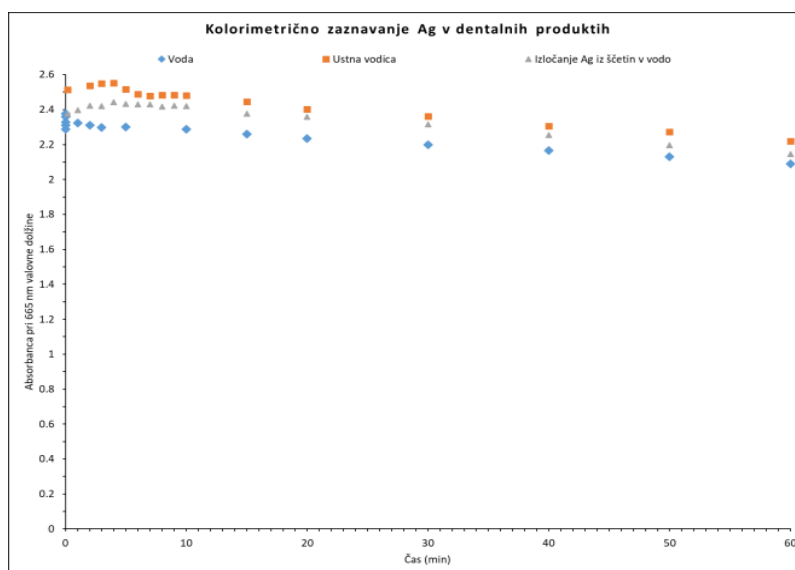
## 5.2.2 Kolorimetrična detekcija srebra v dentalnih vzorcih

Slika 36 prikazuje absorbanco MM v reakciji z  $\text{NaBH}_4$  v treh različnih vzorcih:

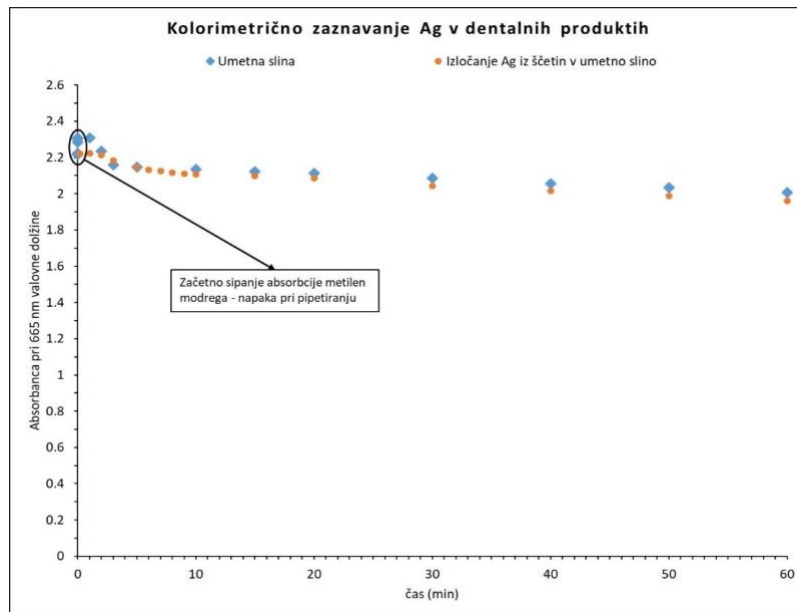
- voda,
- razredčena ustna vodica,
- voda, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka.

Slika 37 prikazuje absorbanco MM v reakciji z  $\text{NaBH}_4$  v dveh različnih vzorcih:

- čista umetna slini,
- umetna slina, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka.



Slika 36: Kolorimetrično zaznavanje poteka reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom v prisotnosti vzorcev dentalnih produktov: modra- voda, oranžna – ustna vodica, siva – voda z delci iz zobne ščetke

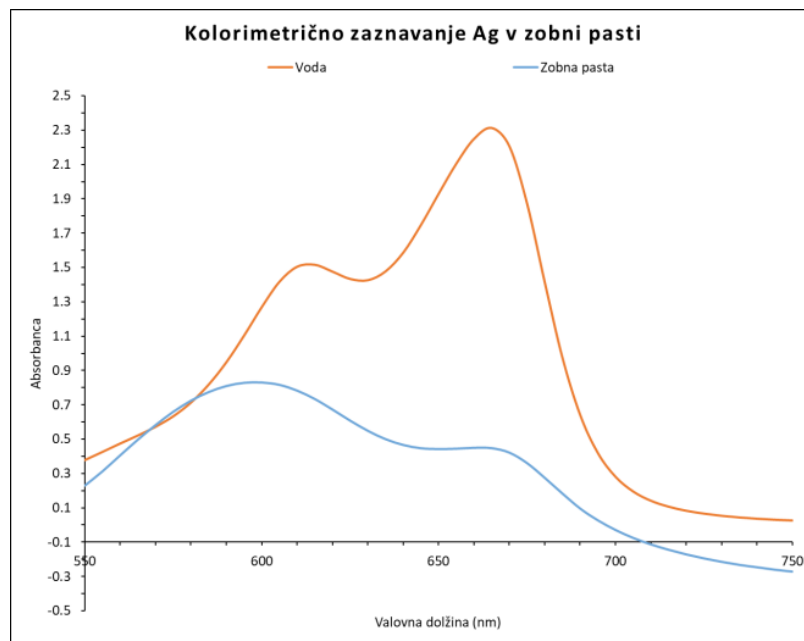


Slika 37: Kolorimetrično zaznavanje poteka reakcije med metilen modrim in natrijevim borohidridom v umetni slini (modro) in zobni ščetki, namakani v umetni slini (oranžno)

Sprememba absorbance pri 665 nm je ob prisotnosti vzorcev dentalnih produktov v vodi (slika 36: oranžna – ustna vodica, siva – delci iz zobne ščetke) in umetni slini (slika 37: oranžna – delci iz zobne ščetke) na slikah 36 in 37 zelo majhna. Razbarvanje MM v prisotnosti vzorcev dentalnih produktov v vodi poteka z enako hitrostjo kot v sami vodi. Ob začetku reakcije je absorbanca v ustni vodici in vodi z zobno ščetko celo večja kot v vodi brez prisotnosti vzorcev. Razlog za ta pojav bi lahko bila napaka v pipetiranju. Obstaja pa tudi možnost, da ustna vodica absorbira svetlobo podobne valovne dolžine kot MM. Tudi na grafu na sliki 37 je sprememba absorbance zelo majhna, s čimer dokažemo, da se tudi v umetni slini nanodelci iz ščetke niso izločali oz. je njihova količina zanemarljiva.

Kljub navedbi proizvajalca, da dentalni produkti vsebujejo srebrove nanodelce, jih mi nismo zaznali. Predpostavljamo, da je bila ustna vodica zaradi vsebnosti različnih bioloških spojin in obarvanosti prekompleksna za zaznavanje s to metodo ali pa je bila vsebnost Ag ND tako majhna (sploh po redčenju), da je nismo zaznali. Tudi vsebnost Ag ND v vodi, v kateri se je namakala zobna ščetka, je bila zanemarljivo majhna oz. se Ag ND iz ščetke sploh niso izločali.

Slika 38 prikazuje absorbanco MM v prvi sekundi reakcije z  $\text{NaBH}_4$  v zobni pasti in vodi.



Slika 38: Absorbanca MM v prvi sekundi reakcije med MM in  $\text{NaBH}_4$  v prisotnosti vzorca zobne paste (modra) v primerjavi z vodo (oranžna)

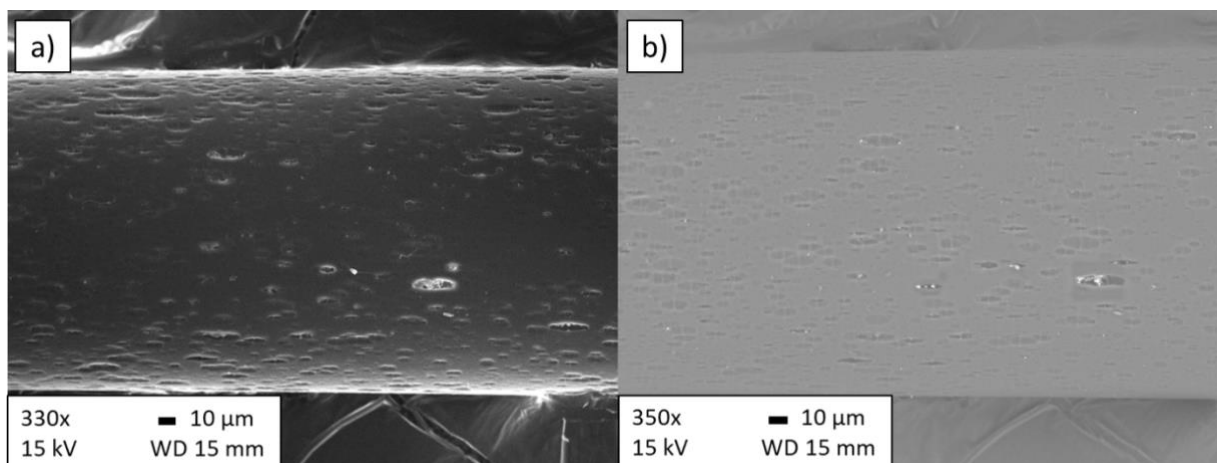
Na sliki 38 opazimo absorbanco MM v prisotnosti vode kot vzorec (slika 38 oranžna) in zobne paste (slika 38 modra). Karakteristična vrha za MM barvilo v prisotnosti zobne paste sta težko prepoznavnja, saj je sama zobna pasta obarvana, kljub temu da smo vzorec dobro razredčili (še bolj kot na sliki 17c). Graf na sliki 38 predstavlja absorbanco že razredčene zobne paste. Sklenili smo, da bi bilo ponovno redčenje nesmiselno, saj bi bila s tem (predvidevana) koncentracija Ag ND zanemarljivo majhna. Zaradi same kompleksnosti vzorca in obarvanosti, smo označili ta vzorec kot neprimeren za to metodo. Da bi lahko ta vzorec uporabili, bi bilo potrebno morebitno prisotne Ag delce najprej iz njega ekstrahirati in jih kasneje tudi očistiti.

## 5.2.3 Karakterizacija vzorcev dentalnih produktov (z elektronsko vrstično mikroskopijo - SEM)

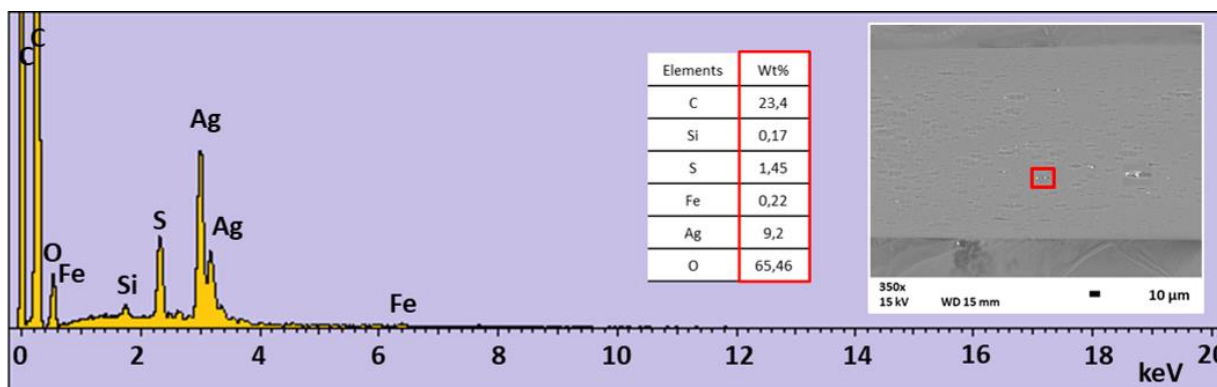
### 5.2.3.1 Zobna ščetka

Zobno ščetko smo s SEM analizirali v treh različnih pogojih. Na nosilec smo nanесли ščetino ter kapljico vodovodne vode in umetne sline, v katerih sta se ščetki 1 mesec namakali (slika 21).

Slika 39 prikazuje mikroskopsko sliko ščetine zobne ščetke, opravljeno z metodo SEM. Slika 40 prikazuje elementarno sestavo zobne ščetke, ki smo jo določili z energijsko disperzijsko spektroskopijo (EDS).



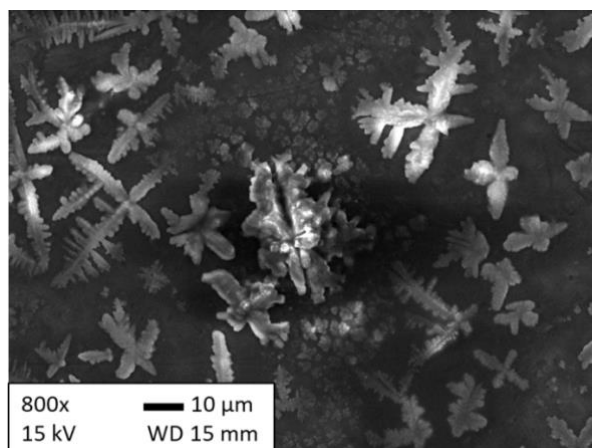
Slika 39: Mikroskopska slika ščetine zobne ščetke: slika sekundarnih elektronov – morfologija (a), slika povratno sipanih elektronov – kompozicija (b)



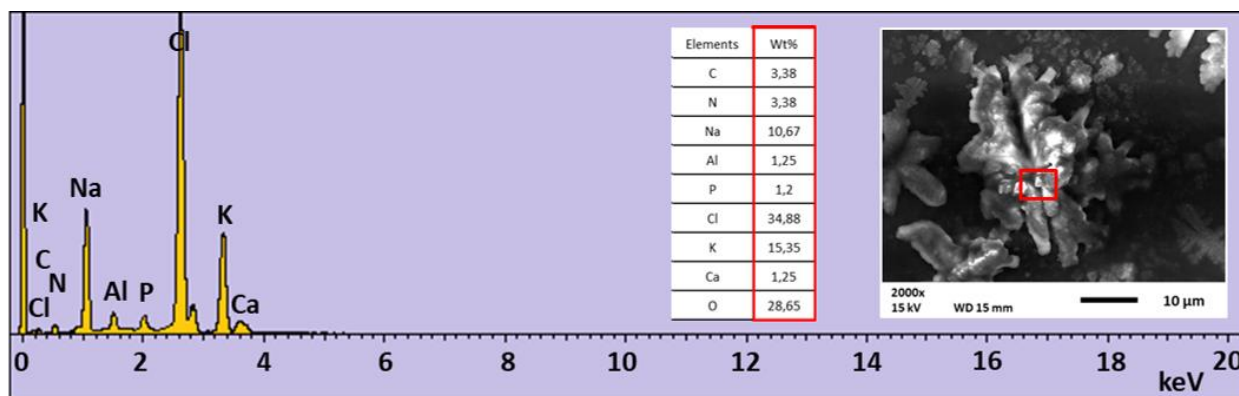
Slika 40: Elementarna sestava ščetine zobne ščetke, analizirana z EDS

Slika 39a predstavlja SEM sliko sekundarnih elektronov, slika 39b pa povratno sipanih. Osredotočili smo se predvsem na vdolbine na površini ščetine, v katerih je vidna prisotnost dodatnih komponent s težjim jedrom (so svetle barve) (slika 39b), zato smo sklepali, da gre za srebro, za katerega proizvajalec navaja, da je prisoten v ščetinah. To smo z EDS tudi dokazali. Poleg srebra smo opazili še prisotnost železa, žvepla in silicija (v majhnih količinah). Večino analiziranega vzorca pa sestavljata kisik in ogljik, ki sta verjetno tudi tu prisotna v obliki organskih spojin in napršene grafitu.

Slika 41 predstavlja sliko umetne sline, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka, opravljena z metodo SEM. Na sliki 42 je prikazana njena elementarna sestava.



Slika 41: SEM slika kapljice umetne sline, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka



Slika 42: Elementarna sestava kapljice umetne sline, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka

Na sliki 42 vidimo večje razgibane delce, različnih oblik. Sklepamo, da gre za kristale soli, ki sestavljajo umetno slino ( $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) in so se tvorili ob sušenju vzorca. Opazili smo prisotnost dušika, kisika in ogljika, ki so sestavni elementi sečnine ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) in drugih soli, ki smo jo prav tako uporabili za pripravo umetne sline. Srebra v vzorcu nismo zaznali, s čimer smo potrdili, da se med namakanjem res ni izločal (kot smo predvidevali na podlagi kolorimetrične detekcije – slika 37).

Mikroskopske slike vode, v kateri se je 1 mesec namakala zobna ščetka, nismo vključili, saj ni bilo vidnih nobenih delcev. Kapljica vode se je na nosilcu posušila in ni ostalo sledi drugih komponent, saj smo za namakanje uporabljali deionizirano vodo, iz katere so odstranjeni ioni mineralov. Če se tudi v vsakdanjem življenju iz analizirane ščetke srebrovi nanodelci (Ag ND) ne izločajo, je to zelo dobro za uporabnike, saj tako niso izpostavljeni nanodelcem iz ščetke. Moramo pa upoštevati, da se je za naše analize namakala le mesec dni in nismo simulirali ščetkanja, ki bi lahko povzročilo izločanje Ag ND.

### 5.2.3.2 *Ustna vodica in zobna pasta*

Želeli smo narediti tudi SEM analizo ustne vodice ter zobne paste, vendar je bilo kljub ustrezni pripravi vzorca z ogljikom naše opazovanje oteženo, saj je vzorec vseboval preveč organskih snovi, ki pa elektronov niso prevajale in smo posledično vzorec »skurili«. Za analizo takšnih vzorcev bi bilo torej potrebno uporabiti drugo metodo, ki bi delovala kljub vsebnosti ostalih sestavin (sorbitol, glicerol, hidriran silicijev dioksid, natrijev dodecilsulfat, PEG-8, celulozna guma, itd.), saj bi lahko s čiščenjem vzorca (da bi odstranili organske komponente) lahko odstranili tudi srebro.

# 6 ZAKLJUČKI

V raziskovalni nalogi smo si zastavili 4 cilje:

1. s pomočjo strokovne oz. znanstvene literature ugotoviti dejanske lastnosti nanosrebra ter objektivno predstaviti tudi potencialne negativne učinke na zdravje,
2. s pomočjo kolorimetrične detekcije, preproste in relativno poceni analzne metode, določiti, ali ti produkti (zobna ščetka, zobna krema in ustna vodica z nanodelci srebra) vsebujejo srebrove nanodelce,
3. preveriti, če je ta metoda ustrezna za vse tri tipe izdelkov z AgND, tako da vsebnost nanosrebra v vzorcih določimo še z drugimi metodami karakterizacije – SEM (vrstična elektronska mikroskopija) in EDS (energijska disperzijska spektroskopija),
4. za preverjanja ustreznosti metode kolorimetrične detekcije pripraviti referenčni vzorec, ki vsebuje srebrove nanodelce, in sicer želimo pripravo referenčnega vzorca izpeljati s pomočjo okolju prijazne metode (biosinteza srebrovih nanodelcev), da se izognemo uporabi prevelikemu številu nevarnih kemikalij, zapletenim sintezam in nevarnim stranskim produktom. V našem referenčnem vzorcu želimo tudi ugotoviti velikost AgND z metodo DLS (lasersko oz. dinamično sipanje svetlobe). s pomočjo strokovne literature ugotoviti dejanske lastnosti nanosrebra.

Po izvedenih eksperimentih lahko na osnovi rezultatov zapišemo spodaj navedene sklepe.

1. Pri pregledu znanstvenih člankov smo našli podatke o pozitivnih in negativnih učinkih nanosrebra. Že dolgo poznana in najbolj oglaševana je antibakterijska lastnost. (2). (3) (4) (5) Novejši znanstveni članki pa dokazujejo tudi telesu potencialno nevarne učinke. Ti učinki lahko povzročijo: poškodbe celičnih komponent (poškodbe DNK, vezave in onesposobitev beljakovin ter celične membrane (28)), AgND se lahko kopičijo v nevronih, če vstopijo v možgane (13), povzročajo bolezni dihal, srca in ožilja (30). S tem smo potrdili našo hipotezo, da dentalni produkti z AgND ogrožajo naše zdravje, saj jih pri uporabi dentalnih izdelkov delno zaužijemo, kar poveča njihovo potencialno nevarnost. Moramo pa se zavedati, da je neškodljivo uporabljati predmete, ki vsebujejo nanodelce srebra (npr. zobno ščetko, deske za rezanje), če ne izločajo delcev.
2. S pomočjo dveh različnih metod: kolorimetrične detekcije in SEM (v kombinaciji z EDS) smo analizirali dentalne produkte in ugotovili:
  - a. pri zobni ščetki nismo zaznali nobenega izločanja AgND, česar nismo pričakovali. Ker smo zobno ščetko namakali en mesec, lahko predvidevamo, da ne pride do eliminacije srebrovih nanodelcev;
  - b. pri zobni pasti ter ustni vodici kolorimterična detekcija ni bila uspešna, saj sta ta produkta imela že svojo obarvanost v opazovanem spektru. Čeprav smo ju razredčili, nismo preprečili absorbanca, ki je motila analizo.
3. Naš referenčni vzorec potrjuje, da sta kolorimetrična detekcija in analiza SEM uspešna za odkrivanje AgND v mokrih vzorcih. Težave so se pojavile pri analizi bolj zapletenih vzorcev, kot so ustne vodice in zobne paste.
  - a. Učinkovitost metode SEM preprečujejo organske snovi, ki povzročajo "kurjenje" molekul na površini, zaradi ne prevajanja bioloških molekul. (17)



- b. Zobna pasta vsebuje barvila, ki motijo UV-vis spektrofotometrijo, ker je njihova absorbanca v svetlobnem spektru, ki smo ga opazovali. To je preprečilo veljavno analizo z uporabo metilen modrega (MM), saj je karakteristični vrh MM barve v prisotnosti zobne kreme, ki je tudi sama obarvana, težko prepoznaven, četudi je primerek dobro razredčen.
- c. Kolorimetrična detekcija v ustni vodici kaže, da obstaja možnost, da ustna vodica absorbira svetlobo podobne valovne dolžine kot MM, saj je absorbanca na začetka te analize nekoliko večja (slika 36), čeprav bi ta pojav lahko bil tudi posledica napake pri pipetiranju. V vsakem primeru pa kolorimetrična detekcija ni zaznala nanosrebra v ustni vodici.

Za izdelke, ki motijo UV-vis spektrofotometrijo s svojo obarvanostjo, bi morali najti drugo metodo, ki ni občutljiva na obarvanost vzorcev. Menimo, da bi bilo zobno ščetko smiselno še enkrat analizirati s pomočjo kolorimetrične prepoznavne, če bi s ščetko dejansko simulirali ščetkanje. S tem bi preverili, če se pri mehanski obremenitvi tudi ne sprosti nič AgND, saj je kolorimetrična analiza enostavna, poceni in je le majhna možnost težav, ki bi lahko pokvarile rezultate (razen napake pri pipetiranju, ki bi jo lahko zmanjšali z večkratno ponovitvijo eksperimenta).

- 4. Postopek za biosintezo referenčnega vzorca AgND je bil preprost in hiter. Potrdili smo vsebnost nanosrebra z uporabo SEM in EDS (sliki 27 in 28) ter določili velikost delcev z uporabo DLS (slika 29). Ko smo primerjali naše rezultate z rezultati podobne sinteze, objavljene v članku *Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from Ocimum basilicum* (40), smo ugotovili, da je naša hipoteza potrjena: če bi v nadaljnjih raziskavah želeli ustvariti manjše nanodelce, bi morala naša biosinteza nanodelcev potekati hitreje, oz. ravno nasprotno za večje delce.

Če povzamemo, avtorji te raziskave menimo, da kolorimetrična detekcija ni primerna za izdelke, ki so že sami po sebi obarvani v opazovanem barvnem spektru in da SEM ni primeren za izdelke, ki vsebujejo različne organske sestavine (npr. zobna krema, ustna vodica, ...). Kljub temu lahko s pomočjo teh metod analiziramo zobno ščetko z delci nanosrebra. Pred izpeljavo te raziskave pa bi bilo potrebno izvesti eksperiment, ki bi dokazal antimikrobne učinke testirane zobne ščetke v primerjavi z navadno.

# 7 KOMENTAR IN NADALJEVANJE

Raziskovanje na področju nanotehnologije se v zadnjih letih močno razvija. Na voljo nam je vedno več podatkov o delovanju nanodelcev, a vseh njihovih učinkov (pozitivnih in negativnih) še nismo raziskali. Opravljeni so bili toksikološki testi večjih koncentracij v kratkem časovnem obdobju, vendar smo v vsakdanjem življenju večinoma izpostavljeni manjšim koncentracijam nanodelcev v daljšem časovnem obdobju. Zato bi morali raziskati učinke nanodelcev v realnih pogojih, kar pa je trenutno zelo zahtevna naloga.

Nanosrebro zaradi antimikrobnih učinkov najdemo tudi v kozmetiki (49), preko katere lahko prav tako preide v naše telo. Ker veliko podjetij, ki izdelujejo kozmetične izdelke, svojih produktov ne testira ustrezno, bi bilo potrebno raziskati vplive nanodelcev v stiku s kožo. Najprej pa moramo doseči, da se ljudje zavedamo neraziskanosti in negativnih učinkov koloidnega srebra, ki smo jih izpostavili v raziskovalni nalogi.

Biosinteza se je v našem primeru izkazala za učinkovit in hiter proces nastajanja nanodelcev. Ker je preprosta in okolju prijazna, se nam zdi smiselna za nadaljnje raziskave, pri katerih je potrebno uporabiti nanodelce.

Ker zobna ščetka ni izločala srebrovih nanodelcev kljub namakanju v umetni slini mesec dni, bi bilo smiselno preveriti, če ima res antimikrobne učinke, le tako bi lahko potrdili kakovost izdelka. Poleg tega bi bilo morda zobno ščetko smiselno še enkrat analizirati s pomočjo kolorimetrične detekcije, če bi s ščetko simulirali ščetkanje. S tem bi preverili, če se pri mehanski obremenitvi dejansko ne sprosti nič AgND.

V raziskovalni nalogi smo s proučevanjem znanstvene literature ugotovili, da naboj vpliva na agregacijo in privlak med nanodelci in reagenti (metilen modro,  $\text{NaBH}_4$ ), zato bi bilo potrebno za boljše razumevanje dogajanja v reakciji raziskati, kako se nanodelci obnašajo, če jim spremenimo naboj (kot so to za zlate nanodelce storili avtorji članka *Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Stabilization by Wet Stirred Media Milling* (48)). V nadaljevanju bi izvedli meritve zeta potenciala različnih nanodelcev in primerjali njihove lastnosti (npr. sposobnost aglomeracije).

# 8 BIBLIOGRAFIJA

1. Tolochko, N. K. History of Nanotechnology. *UNESCO-EOLSS*. [Elektronski] 2009. <http://www.eolss.net/sample-chapters/c05/E6-152-01.pdf>.
2. Magdalena Parlinska-Wojtan, Małgorzata Kus-Liskiewicz, Joanna Depciuch, Omowunmi Sadik. Green synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using camomile terpenoids as a combined reducing and capping agent. *Springer Link*. [Elektronski] 15. april 2016. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00449-016-1599-4>.
3. Sebastian Grade, Jörg Eberhard, Jurij Jakobi, Andreas Winkel, Meike Stiesch, Stephan Barcikowski. Alloying colloidal silver nanoparticles with gold disproportionally controls antibacterial and toxic effects. *Springer Link*. [Elektronski] 17. november 2013. [Navedeno: 13.. december 2018.] <https://link.springer.com/article/10.1007/s13404-013-0125-6>.
4. Tomšič, Brigita. Vpliv velikosti delcev srebra na baktericidno učinkovitost celuloznih vlaken. *Tekstilec*. [Elektronski] 2009. <http://www.tekstilec.si/wp-content/uploads/2009/08/Vpliv-velikosti-delcev-srebra-na-baktericidno-u%C4%8Dinkovitost-celuloznih-vlaken.pdf>.
5. H. J. Lee, S. Y. Yeo, S. H. Jeong. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal. *Springer Link*. [Elektronski] maj 2003. [Navedeno: 22.. november 2018.] <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023736416361>.
6. V. Golja. NIJZ odsvetuje uporabo koloidnega srebra. *Nacionalni inštitut za javno zdravje*. [Elektronski] 24. julij 2014. [Navedeno: 20. september 2018.] <http://www.nijz.si/sl/nijz-odsvetuje-uporabo-koloidnega-srebra-nano-srebra-0>.
7. Kapitanovič, Pija. Koloidno srebro je izredno škodljivo in za uporabo ni dovoljeno. *Svet kapitala*. [Elektronski] 12. oktober 2018. <https://svetkapitala.delo.si/trendi/koloidno-srebro-je-izredno-skodljivo-in-za-uporabo-ni-dovoljeno-6665>.
8. Doctor Plotka's Mouthwatchers. DOCTOR PLOTKA'S MOUTHWATCHERS. *Mouthwatchers antimicrobial floss bristle silver toothbrush adult 20 pack*. [Elektronski] [Navedeno: 4.. junij 2018.] <https://www.mouthwatchers.com/collections/superior-manual-toothbrushes/products/mouthwatchers-antimicrobial-floss-bristle-silver-toothbrush-adult-20-pack>.
9. Dentavit. ebay. *Toothpaste dentavit antimicrobial silver without fluorine X5*. [Elektronski] [Navedeno: 8. junij 2018.] <https://www.ebay.com/itm/Toothpaste-dentavit-antimicrobial-silver-without-fluorine-X5/252712703364?hash=item3ad6d9d584:g:~EsAAOSwnHZYb83c>.
10. Silver Tongue Oral Care - All Natural Colloidal Silver Mouthwash, 16 oz. ebay. [Elektronski] silver-botanicals. [Navedeno: 8.. junij 2018.] <https://www.ebay.com/itm/Silver-Tongue-Oral-Care-All-Natural-Colloidal-Silver-Mouthwash-16-oz/323392763387?epid=1312375882&hash=item4b4bb5f5fb:g:ai0AAOSwTxpZsXUd:rk:1:pf:0>.

11. *ekemija*. [Elektronski] [http://ekemija.osbos.si/e-gradivo/6-sklop/nanotehnologija\\_osebna\\_znanja.html?fbclid=IwAR06zPrBKpzVlb04Vumv7Ed0SCEKQJDijGKZSFst0oP0LCMOqa\\_sjvcgKd0](http://ekemija.osbos.si/e-gradivo/6-sklop/nanotehnologija_osebna_znanja.html?fbclid=IwAR06zPrBKpzVlb04Vumv7Ed0SCEKQJDijGKZSFst0oP0LCMOqa_sjvcgKd0).
12. European Commission. Official Journal of the European Union. *Commission Recommendation 2011/696/EU of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial*. L275(54), 2011.
13. Remškar, Maja. Nanotehnologije, priložnosti in tveganja. *Gospodarska zbornica Slovenije*. [Elektronski] [Navedeno: 20.. januar 2019.] <https://www.gzs.si/pripone/Nanotehnologije,%20prilo%C5%BEnosti%20in%20tveganja.pdf>.
14. *Pixabay*. [Elektronski] 13. junij 2016. [Navedeno: 19. februar 2019.] <https://pixabay.com/en/lotus-effect-drip-water-structure-1452667/>.
15. Lotus effect. *Wikipedia*. [Elektronski] 24. november 2018. [Navedeno: 18. februar 2019.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Lotus\\_effect](https://en.wikipedia.org/wiki/Lotus_effect).
16. Drame, Anja. *Colorimetric assay for TiO2 nanoparticles detection in complex matrices as food samples*. Ljubljana : s.n., 2017.
17. Hamers, Laurel. Nano-Sensors: Small size, big impact. *Sustainable nano*. [Elektronski] 23. september 2014. <http://sustainable-nano.com/2014/09/23/nano-sensors-small-size-big-impact/>.
18. Kogej, Ksenija. *Površinska in koloidna kemija*. Ljubljana : Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2015. 978-961-6756-56-3.
19. Center for Sustainable Nanotechnology. *Sustainable nano*. [Elektronski] 23. september 2014. [Navedeno: 13. december 2018.] <http://sustainable-nano.com/2014/09/23/nano-sensors-small-size-big-impact/>.
20. Remškar, Maja. Nanodelci in nanovarnost. *Kemijsko varen*. [Elektronski] november 2009. [http://www.kemijskovaren.si/files/nano\\_knjiga.pdf](http://www.kemijskovaren.si/files/nano_knjiga.pdf).
21. Dobravec, Anja. Interakcija lipidnih membran z nanodelci. *LABORATORY OF BIOPHYSICS*. [Elektronski] 8. marec 2016. [http://www.lbf.ijs.si/Downloads/seminars/AnjaDobravec\\_seminar-InterakcijaLipidnihMembranZNanodelci\\_2016.pdf](http://www.lbf.ijs.si/Downloads/seminars/AnjaDobravec_seminar-InterakcijaLipidnihMembranZNanodelci_2016.pdf).
22. Charles T. Campbell, Hong Yang, Younan Xia,. Nanoparticles for Catalysis. *Accounts of chemical research*. [Elektronski] avgust. 20 2013. [Navedeno: 14. januar 2019.] <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar400148q>.
23. Jan Harb, Maja Harb. Digitalna knjižnica Slovenije. *Ali znamo izkoriščati neprimerljivo prednost narave v iskanju tehničnih rešitev?* [Elektronski] 2016. [Navedeno: 18.. februar 2019.] <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-S1YTGB4J>. NBN:SI:DOC-S1YTGB4J.

24. Thierry Darmanin, Frederic Guittard. Superhydrophobic and superoleophobic properties in nature. *Science Direct*. [Elektronski] junij 2015. [Navedeno: 15. februar 2019.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702115000024>.
25. Remškar, Maja. *Nanovarnost in detekcija nanodelcev*.
26. Zavod za varstvo pri delu. Nanodelci in njihov vpliv na zdravje (2. del). *Delo in varnost*. [Elektronski] 2014. [Navedeno: 18. februar 2019.] [http://www.zvd.si/media/medialibrary/2016/01/DV-04-2014-Nanodelci\\_in\\_njihov\\_vpliv\\_na\\_zdravje.pdf](http://www.zvd.si/media/medialibrary/2016/01/DV-04-2014-Nanodelci_in_njihov_vpliv_na_zdravje.pdf).
27. Seč, David. Koloidi. *Fakulteta za matematiko in fiziko*. [Elektronski] december 2009. [http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/files/2009\\_2010/1-sec\\_seminar\\_koloidi.pdf](http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/files/2009_2010/1-sec_seminar_koloidi.pdf).
28. Grahovac, Aleš. Določevanje srebrovih zvrsti v tekočih vzorcih. *Core*. [Elektronski] 2016. [Navedeno: 22. november 2018.] <https://core.ac.uk/download/pdf/143471328.pdf>.
29. Viviana Golja, Agnes Šomen Jokšič, Bojana Bažec. *Nanotehnologija v našem okolju in zdravje*. NIJZ : s.n., 2018.
30. Plušček, Sebastijan. Vpliv koncentracije in načina sinteze na velikost srebrovih nanodelcev, njihovo protimikrobno učinkovitost in uspešnost vključitve v hidrogel. *Zveza prijateljev mladine Maribor*. [Elektronski] 2015. [https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2015/06/S%C5%A0\\_INTER\\_KE\\_ZV\\_Vpliv\\_koncentracije\\_in\\_na%C4%8Dina.pdf](https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2015/06/S%C5%A0_INTER_KE_ZV_Vpliv_koncentracije_in_na%C4%8Dina.pdf).
31. vizita.si. 'Čudežni naravni' antibiotik lahko prinese nevarno reakcijo. [Elektronski] 25. julij 2014. [Navedeno: 28. februar 2019.] <http://vizita.si/clanek/novice/cudezni-naravni-antibiotik-v-resnici-strupen.html>.
32. LAH MEDIKAL CENTER. *Koloidno srebro*. [Elektronski] [Navedeno: 9. november 2018.] <https://lahmedikal.si/koloidno-srebro/>.
33. Consumer Products Inventory. *The Project on Emerging Nanotechnologies*. [Elektronski] [Navedeno: 29. november 2018.] <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>.
34. Anuradha, B. Syama Sundar, J. Sreekanth kumar, M. V. Ramana. *Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from Ocimum basilicum L. var.thyrsiflorum*. s.l. : European Journal of Academic Essays, 2014. 2183-1904.
35. Nguyen Thi Mai Tho, Tran Nguyen Minh An, Mai Dinh Tri, Thupakula Venkata Madhukar Sreekanth, Jae-Soon Lee, Patnamsetty Chidanandha Nagajyothi, Kap Duk Lee. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Nelumbo nucifera Seed Extract and its Antibacterial Activity. *Slovenian Chemical society*. [Elektronski] 2013. <https://journals.matheo.si/index.php/ACSi/article/view/105/92>, Čajevec <http://acta-arhiv.chem-soc.si/57/57-4-808.pdf>.
36. Brajesh Kumari, Kumari Smita, Luis Cumbal, Alexis Debut. Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts. *Science Direct*. [Elektronski] december 2014.

[Navedeno: 14. oktober 2018.]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X14000771?via%3Dihub>.

37. Jae Yong Song, Beom Soo Kim. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Springer Link*. [Elektronski] 26. April 2008. [Navedeno: 22. november 2018.]  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-008-0224-6>.

38. Alia Bilal, Nasreen Jahan, Ajj Ahmed, Saima Naaz Bilal, Shahida Habib, Syeda Hajra. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES ON OCIMUM BASILICUM LINN. [Elektronski]  
<https://pdfs.semanticscholar.org/9fc6/9c94c6beadb427973338364c37150646d66.pdf>.

39. Dale E. Newbury, Nicholas W. M. Ritchie. Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative? *Wiley online library*. [Elektronski] 9. avgust 2012. [Navedeno: 28. februar 2019.] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sca.21041>.

40. *Heterogeneous catalysis*. [Elektronski] [Navedeno: 7. januar 2019.]  
<https://nptel.ac.in/courses/103103026/module2/lec7/5.html>.

41. Pelipenko, Jan. Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev z resveratrolom za terapijo revmatoidnega artritisa. *Univerza v Ljubljani Fakulteta za farmacijo*. [Elektronski] 2010. [Navedeno: 1. marec 2019.]  
[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2010/Pelipenko\\_Jan\\_dipl\\_nal\\_2010.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2010/Pelipenko_Jan_dipl_nal_2010.pdf).

42. LSI Instruments. [Elektronski] [Navedeno: 28. februar 2019.]  
<https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>.

43. C. Corredor, M. D. Borysiak, J. Wolfer, P. Westerhoff and J. D. Posner. Environmental Science & Technology. *Colorimetric detection of catalytic reactivity of nanoparticles in complex matrices*. 49, 2015, str. 46.

44. William Reusch. Visible and Ultraviolet Spectroscopy. *Chemistry*. [Elektronski]  
<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>.

45. Reusch, William. *Visible and Ultraviolet Spectroscopy*. [Elektronski] 5. maj 2013. [Navedeno: 12. marec 2019.] <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>.

46. *Colometric detection of Catalytic Reactivity of Nanoparticles in Complex Matrices*. Environmental Science and Technology.

47. K. J. Knutson, D. W. Berzins. Corrosion of orthodontic temporary anchorage devices. *The European Journal of Orthodontics*. 2013, Izv. 35, str. 35, 500-506.

48. Matej Baláž, Ľudmila Balážová, Nina Daneu, Erika Dutková, Miriama Balážová, Zdenka Bujňáková, Yaroslav Shpotyuk. Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Stabilization by Wet Stirred Media Milling. *Springer Link*. [Elektronski] 1. februar 2017. [Navedeno: 28. februar 2019.]  
<https://link.springer.com/article/10.1186/s11671-017-1860-z>.

49. Swati Gajbhiye, Satish Sakharwade. Silver nanoparticles in cosmetics. *Scientific Reasearch publishing*. [Elektronski] 28. marec 2016. [Navedeno: 11. marec 2019.] [https://file.scirp.org/pdf/JCDSA\\_2016032814370646.pdf](https://file.scirp.org/pdf/JCDSA_2016032814370646.pdf).
50. Pirc, Elizabeta Tratar. *Kemija za trajnostni razvoj*.
51. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Nelumbo nucifera Seed Extract and its Antibacterial Activity. [Elektronski] <https://journals.matheo.si/index.php/ACSi/article/view/105/92>.
52. Andrej Jerkič. Določevanje koncentracij in testiranje baktericidnega delovanja koloidnega srebra v vodi. *Repozitorij Univerze v Novi Gorici*. [Elektronski] 2016. [Navedeno: 22. november 2018.] <http://repozitorij.ung.si/lzpisGradiva.php?id=2322>.
53. Min, Ji-Seon;Kim, Kyoung-Su;Kim, Sang-Woo;Jung, Jin-Hee;Lamsal, Kabir;Kim, Seung-Bin;Jung, Moo-Young;Lee, Youn-Su. Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. *Korea Science*. [Elektronski] 12.. januar 2009. [Navedeno: 22.. november 2018.] [http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1PPBG\\_2009\\_v25n4\\_376](http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1PPBG_2009_v25n4_376).
54. Lavrinc, Špela. Antimikrobno delovaje izbranih nanodelcev na bakterije in glive. *Digitalna knjižnica Biotehniške fakultete*. [Elektronski] 2010. [Navedeno: 22. november 2018.] [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn\\_lavrinc\\_spela.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_lavrinc_spela.pdf).
55. Daintith, ohn. Oxford Reference. <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199204632.001.0001/acref-9780199204632-e-2127>. [Elektronski] Oxford University Press, 2008.
56. Daintith, John. Oxford refrence. *Oxford index*. [Elektronski] Oxford University Press, 2008. <http://www.oxfordreference.com>.
57. Beer-Lambert Law. *Science Direct*. [Elektronski] 2013. [Navedeno: 25. 02 2019.] <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/beer-lambert-law>.