ZELENA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA I NJIHOVO ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE

Galinović, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:964705

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Tea Galinović

ZELENA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA I NJIHOVO ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Valentina Pavić

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij: Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

ZELENA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA I NJIHOVO ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE

Tea Galinović

Rad je izrađen: na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka
Mentor: doc. dr. sc. Valentina Pavić

Kratak sažetak: Nanotehnologija je područje koje naglo raste pronalazeći primjenu u znanosti i tehnologiji. Nova svojstva nanočestica omogućavaju im širok spektar primjene kao što je borba protiv mikroba, razvoj novih lijekova, pročišćavanje vode i zraka te zaštita od stvaranja biofilmova. Fizičke i kemijske metode sinteze imaju svoje prednosti, no proizvodnja predstavlja rizik za okoliš, a produkt nije u potpunosti pogodan za medicinsku primjenu. Povećana svijest prema zelenoj kemiji dovela je do razvoja alternativnih, ekološki prihvatljivih metoda sinteze.

Broj stranica: 17
Broj slika: 4
Broj tablica: 0
Broj literaturnih navoda: 22
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: nanočestice srebra, zelena sinteza, antimikrobna aktivnost, toksičnost
Datum ocjene:
Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTARY CARD

Final thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijeku
Department of Biology
Undergraduate Study of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

GREEN SINTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Tea Galinović

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry
Supervisior: Valentina Pavić, Assistant Professor
Short abstract: Nanotehnology is emerging as a rapidly growing field with its application in science and technology. Nanoparticles exibit completely new properties and various posibilities of application, such as antimicrobial, new drug development, water and air purificatiom and protection from biofilm creation. Physical and chemical syntesis have their advantages, but with possible undesired impacts on environmental life, and the product is not entirely suitable for medical applications. Today, because of new green approach, we have alternative, ecofriendly methods of nanoparticle synthesis.

Number of pages: 17
Number of figures: 4
Number of tables: 0
Number of references: 22
Original in: Croatian
Keywords: silver nanoparticles, green synthesis, antimicrobial activity, toxicity
Date of grading:
Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Nanočestice srebra 1
1.2. Zelena kemija 3
2. OSNOVNI DIO 3
2.1. Zelena sinteza nanočestica srebra 3
2.2. Biološke metode 4
2.2.1. Sinteza posredovana bakterijama 4
2.2.2. Sinteza posredovana gljivicama 5
2.2.3. Sinteza posredovana algama 5
2.2.4. Sinteza posredovana biljkama 5
2.3. Mehanizam sinteze nanočestica srebra 6
2.3.1. Faktori koji utječu na sintezu 7
3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST 7
3.1. Mehanizam antmikrobne aktivnosti 8
3.2. Nanočestice srebra u medicini 9
3.2.1. Aktivno djelovanje protiv biofilma 10
3.2.2. Antibakterijski vodeni filtri 11
3.2.3. Antimikrobni filteri zraka 11
3.3. Utjecaj na ljude 11
3.3.1. Citotoksičnost kod tumora 12
4. UTJECAJ NA OKOLIŠ 13
5. ZAKLJUČAK 14
6. LITERATURA 15

1. UVOD

Nanotehnologija je nova interdisciplinarna grana znanosti koja se oslanja na temeljna svojstva čestica nano veličine. Predznak nano odnosi se na čestice koje variraju od veličine 1 do 100 nm, i koje kao takve imaju nova svojstva. S novim svojstvima dolazi i veća mogućnost primjene bazirane na njihovoj veličini, morfologiji i raspodjeli.

Povećani razvoj otpornosti bakterija na antibiotike predstavlja ozbiljan problem za javno zdravstvo. Zbog sve više mikroba koji razvijaju rezistenciju, razvoj novih lijekova postaje veliki izazov za znanstvenu zajednicu. Srebro je dugo poznato po svojim antimikrobnim svojstvima i kao takvo ima veliki potencijal u nanotehnologiji. Potreba za razvojem nove razine obrane rezultirala je velikim interesom za upotrebom nanočestica srebra, koje su pokazale obećavajuće rezultate.

Zbog skupih i potencijalno opasnih metoda sinteze, koji ujedno rezultiraju proizvodom neprihvatljivim za primjenu u medicinske svrhe, sve češće se koriste ekološki prihvatljive metode koje su u skladu s filozofijom zelene kemije. Metode koje uključuju mikroorganizme, enzime ili biljke nude se kao jednostavne alternative kemijskoj i fizikalnoj sintezi.

1.1. Nanočestice srebra

Sinteza nanočestica srebra od velikog je interesa za znanstvenu zajednicu zbog njihovog širokog raspona primjene. Nanočestice srebra imaju karakteristična fizička, kemijska i biološka svojstva, koja se pripisuju katalitičkoj aktivnosti, antibakterijskim učincima i velikim mogućnostima primjene u nanobiotehnološkim istraživanjima (Firdhouse i Lalitha, 2015). Jedno od najznačajnijih novih svojstava je povećanje površine u odnosu na volumen. Ta karakteristika dovodi do povećane dominacije atoma na površini, nasuprot onih u unutrašnjosti, uzrokujući promjenu mehaničkih, toplinskih i katalitičkih osobina materijala (Sunkar i Nachiyar, 2012). Metalne nanočestice mogu se dobiti brojnim metodama, no najpoznatije koje se koriste su kemijske ili fizičke (Firdhouse i Lalitha, 2015). Iako se ovim postupcima najbolje kontrolira veličina i oblik čestica, one nisu sasvim pogodne za upotrebu u medicinske svrhe (Balashanmugan i Kalaichelvan, 2015).

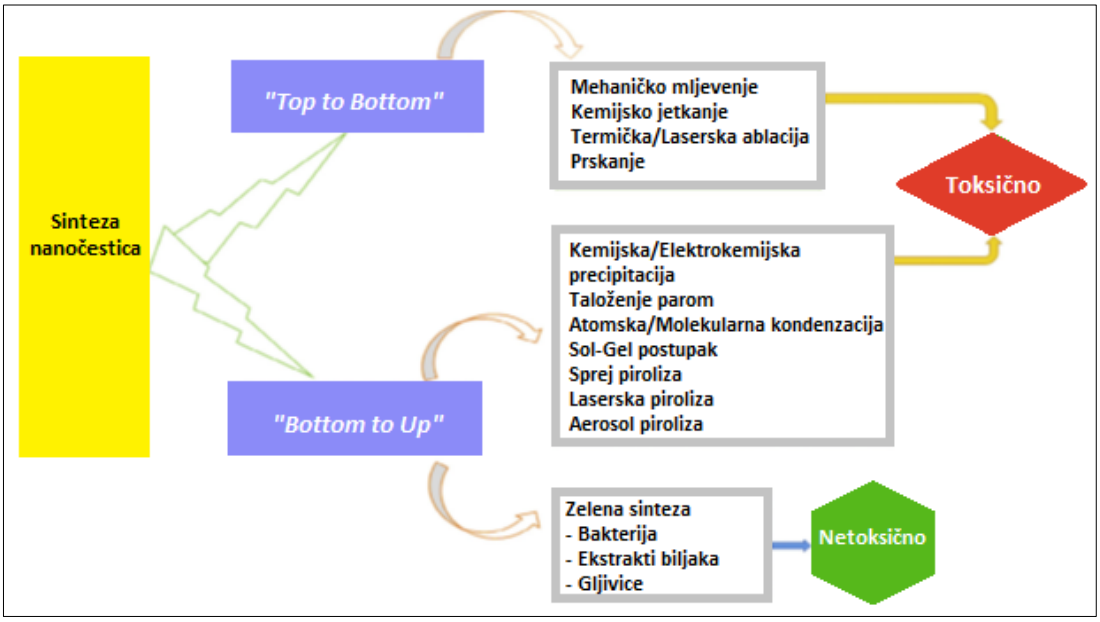
Nanočestice srebra mogu se dobiti dvjema glavnim metodama. Metoda „*Top to Bottom*“ uključuje mehaničko mljevenje materijala i stabilizaciju dobivenih nanočestica dodatkom stabilizirajućeg agensa, dok metoda „*Bottom to Up*“ uključuje redukciju metala (Prabhu i Poulose, 2012). Metoda koja se najviše koristi je kemijska redukcija. Reducensi koji se koriste tijekom kemijskih metoda su borohidrid, citrat, askorbat i elementarni vodik. Čestice srebra

dobivene u vodenim otopinama imaju promjer od nekoliko nanometara. Inicijalno, redukcija različitih kompleksa sa srebrovim ionima vodi do stvaranja atoma srebra, koju slijedi aglomeracija u oligomerne skupine iz kojih će se u konačnici formirati koloidne čestice srebra.

Kontrola kemijske redukcije izvodi se u dva koraka. Prvo se koristi jaki reducens za dobivanje manjih čestica, koje se u drugom koraku redukcije sa slabijim reducensom povećavaju s otprilike 20-45 nm na čestice od 120-170 nm. Radi sprječavanja grupiranja koloida, kemijska redukcija izvodi se u prisutnosti stabilizatora (Sharma i sur., 2009).

Kemijske i fizičke metode daju čiste i dobro oblikovane nanočestice, no kemikalije korištene prilikom sinteze su toksične, troše energiju, skupe i neprikladne za biološku aplikaciju (Firdhouse i Lalitha, 2015). Opasnost za okoliš dolazi od kemikalija koje se koriste kao prekursori, toksičnih otapala kao i od nusproizvoda. Kao posljedica razvija se novo područje istraživanja koje upotrebljava biološke sustave za sintezu nanočestica (Sunkar i Nachiyar, 2012).

U novije vrijeme biosinteza nanočestica prepoznata je kao zasebna grana u razvoju nanotehnologije, gdje se mikroorganizmi, biljna biomasa ili ekstrakti nameću kao alternativa kemijskim i fizikalnim metodama. U ovakvim postupcima nestaje potreba za visokim temperaturama, tlakom, energijom i naravno toksičnim elementima, a kao prednosti navode se i velike financijske uštede (Ahmed i sur. 2016). Korištenje alternativnih metoda koje su ekološki prihvatljive odgovornost je svakog istraživača na ovom području.



Slika 1. Različiti pristupi sinteze nanočestica
(preuzeto i modificirano prema Ahmed i sur. 2016)

1.2. Zelena kemija

Zelena kemija nije grana znanosti već novi filozofski pristup koji kroz aplikaciju svojih načela može doprinijeti održivom razvoju. Kemijski procesi i produkti koji su potencijalna prijetnja okolišu zamjenjuju se onima koji su sigurni. Potiču se pronalasci novih procesa, počevši od inicijalnih materijala koji ne zagađuju, do produkata i oblika sinteze koji sprječavaju nastanak onečišćenja (Wardencki i sur. 2005).

Zelena sinteza obuhvaća tri glavna koraka koja su u skladu s perspektivom zelene kemije. Koraci podrazumijevaju odabir prihvatljivog otapala, ekološki neškodljivog reducirajućeg agensa i odabir netoksičnih supstanci za stabilizaciju nanočestica (Sharma i sur. 2009).

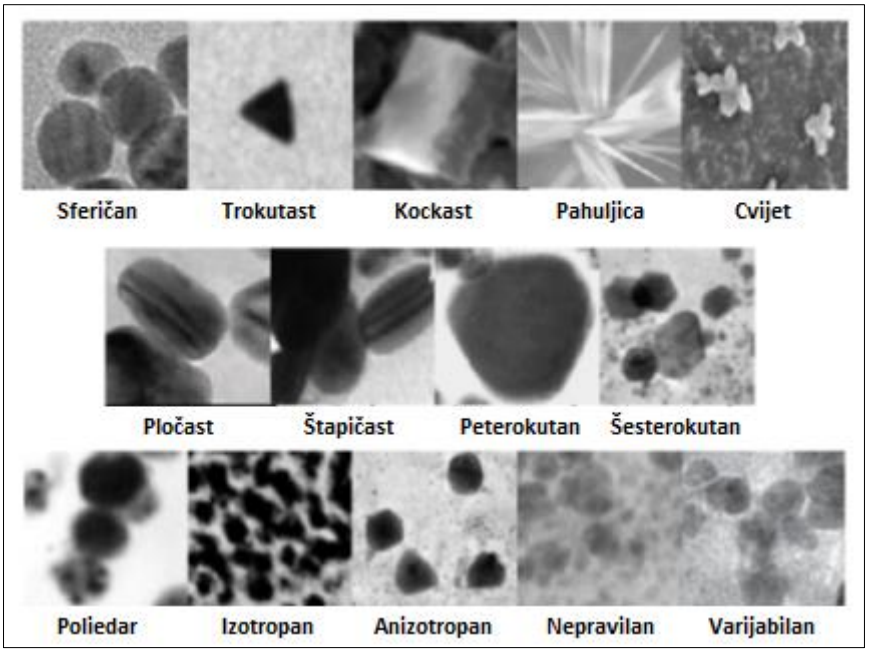
2. OSNOVNI DIO

2.1. Zelena sinteza nanočestica srebra

Ekstrakti organizama mogu se koristiti i kao reducensi i kao stabilizatori u sintezi nanočestica. Reducensi srebrovih iona kao što su aminokiseline, polisaharidi, proteini i vitamini koji se nalaze u ekstraktu bezopasni su za okoliš (Sharma i sur. 2009).

Pojava žute do smećkaste boje u do tada bezbojnoj otopini indikator je sintetiziranih nanočestica. Kod metalnih nanočestica kao što je srebro ova boja rezultat je SPR fenomena (engl. *Surface plasmon resonance* - rezonancija površinskih plazmona). SPR je kolektivna oscilacija slobodnih elektrona metalnih nanočestica u rezonanciji sa frekvencijom svjetlosnog vala zbog čega se pojavljuje obojeni pojas (Firdhouse i Lalitha, 2015). Ispitivanje SPR pojasa UV-Vis spektrometrom radi se zbog analize utjecaja pH, koncentracije metalnih iona i sastava ekstrakta na stvaranje nanočestica.

Morfološka analiza radi se pomoću SEM/TEM-a, a oblici mogu varirati od sferičnih, trokutastih, štapičastih, nepravilnih i drugih (Slika 2.). Stabilnost nanočestica varira od jednog dana do godinu dana i uglavnom ovisi o reducirajućem agensu, ali i o uvjetima u kojima se odvijala sinteza. Starenje čestica utječe na promjenu sferičnog oblika u oblike nalik cvijetu (Srikar i sur. 2016).



Slika 2. Različiti oblici sintetiziranih nanočestica srebra
(preuzeto i modificirano prema Srikar i sur. 2016)

2.2. Biološke metode

2.2.1. Sinteza posredovana bakterijama

Upotreba bakterija za sintezu dobiva na važnosti zbog uspješnosti metode, lakog rukovanja i mogućnosti genetičke modifikacije. Biosintetske metode pomoću bakterija mogu se podijeliti na intracelularnu i ekstracelularnu sintezu, ovisno o mjestu gdje se formiraju nanočestice. Bakterije je moguće koristiti kao biotvornice za sintezu nanočestica srebra. Prvi takav poznati slučaj sinteze bio je posredovan bakterijom *Pseudomonas stutzeri* AG259, izoliranom iz rudnika srebra, koja je akumulirala nanočestice unutar periplazmatskog prostora. U sojevima bakterija kao što su *Bacillus amyloliquefaciens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli* i *Bacillus megaterium* također je uspješno inducirana sinteza. Redukcija u nanočestice moguća je i otpuštanjem bakterijskih biomolekula u vanjski medij u kojem će se one oformiti (Velusamy i sur. 2015; Singh i sur. 2015). U studiji Ibrahim, 2014., uspješno su sintetizirane nanočestice srebra pomoću biomase endofitne bakterije *Bacillus cereus* izolirane iz biljke *Garcinia xanthochymus*. Izlaganje otopine s ionima srebrovog nitrata biomasi bakterije rezultiralo je redukcijom iona u nanočestice.

2.2.2. Sinteza posredovana gljivicama

Stanična masa ili ekstracelularne komponente iz gljivica kao što su *Fusarium oxysporum, Aspergillus flavus, Aspergillus clavatus* i *Penicillium brevicompactum* koriste se za redukciju nanočestica srebra. Gljivice posjeduju neke karakteristične prednosti nad ostalim organizmima. Micelijske mreže mogu podnijeti pritisak, uzburkanost, tok i mnoge druge uvjete u bioreaktorima za razliku od bakterija ili biljnog materijala. Lako ih je uzgojiti i rukovati s njima. Ekstracelularna sekrecija reduktivnih proteina je velika i lako je rukovati s njima u procesu. S obzirom da je precipitat s nanočeticama izvan stanice lišen nepotrebnih komponenti, može se direktno primjenjivati (Velusamy i sur., 2016).

2.2.3. Sinteza posredovana algama

U studiji de Aragao i sur. 2016., nanočestice srebra pripremljene su koristeći izolirani polisaharid koji se prirodno nalazi u crvenoj algi *Gracilaria birdira*. Polisaharid se koristio i kao reducens i kao stabilizator u postupku.

Proteini u ekstraktu zelene alge *Chlorella vulgaris* također su imali dvostruku funkciju, u redukciji Ag^+ i u kontroli oblika nanočestica srebra. Karboksilna skupina u aspartatskom i/ili glutamatskom ostatku i hidroksilna skupina u tirozinskom ostatku proteina smatraju se odgovornima za redukciju Ag^+ (Sharma i sur. 2009). U studiji Salari i sur. 2016 za reducens se koristila makroalga *Spirogyra varians*, a dobivene čestice bile su male veličine, uniformnog izgleda i prikladne disperzije.

2.2.4. Sinteza posredovana biljkama

Sinteza posredovana mikroorganizmima nije najbolje rješenje za industrijsku proizvodnju jer zahtjeva skup medij i visoko aseptične uvjete (Velusamy i sur. 2016). Brojne studije izvještavaju o biljkama koje su korištene prilikom sinteze koja je vrlo jednostavna. Tako je moguća sinteza pomoću ekstrakta luka, *Allium cepa* (Khalilzadeh i Borzoo, 2016), naranče, *Citrus sinensis* (Logeswari, 2015), ekstrakta bananine kore, *Musa paradisiaca* (Ibrahim, 2015). Premda je postupak sinteze korištenjem biljnog ekstrakta vrlo jednostavan i zahtjeva manje uloženog vremena, disperzija nanočestica nije uvijek uniformna (Singh i sur. 2015).

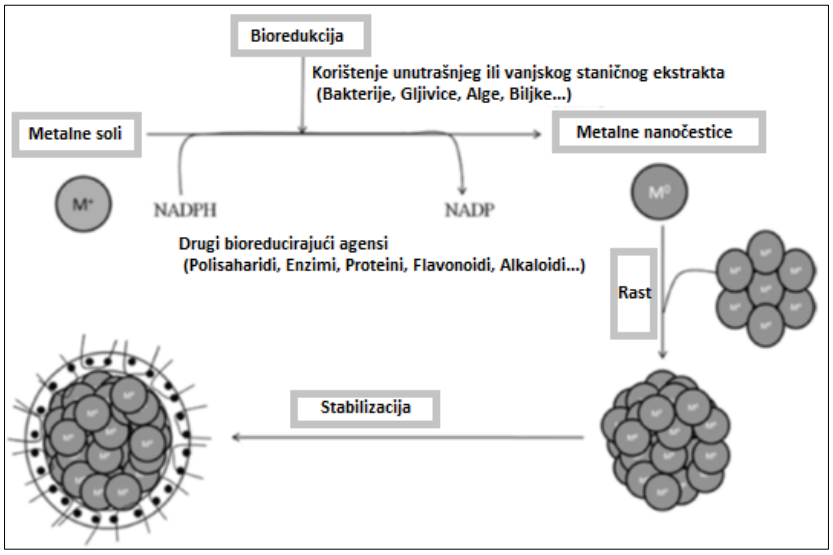
Za ekstrakciju reducirajućih agensa iz biljaka preferira se voda, no moguće je koristiti i organska otapala kao što su metanol, etanol i etilni acetat. Biljne materijale moguće je tretirati u slanim ili acetatnim atmosferama prije ekstrakcije. U većini slučajeva komponente ekstrakta

(metaboliti, proteini i klorofil) prisutne u stanici služe kao stabilizatori, stoga ih nije potrebno naknadno dodavati (Srikar i sur. 2016).

2.3. Mehanizam sinteze nanočestica srebra

Za proizvodnju nanočestica, intracelularni ili ekstracelularni ekstrakt organizama jednostavno se pomiješa s otopinom metalnih soli na sobnoj temperaturi. Reakcija je gotova za nekoliko minuta (Velusamy i sur. 2016). Za početak postupka potrebna je otopina s ionima srebra i reducirajući biološki agens. Kao najbolja opcija u slučaju otopina pokazala se otopina srebrovog nitrata $AgNO_3$ s koncentracijom Ag^+ iona između 0.1 – 10 mm (najčešće 1mm). Reducirajući agensi su široko rasprostranjeni u biološkim sustavima, pa je sinteza nanočestica moguća pomoću različitih organizama iz carstava *Monera, Protista, Fungi* i *Plantae*. Koriste se biomase mikroorganizama, bio-polimeri i ekstrakti biljka (Srikar i sur., 2016).

Ekstrakti mogu djelovati i kao reducirajući agensi i kao stabilizirajući agensi u sintezi nanočestica srebra. Redukcija Ag^+ iona izvodi se kombinacijom biomolekula iz ekstrakta kao što su enzimi/proteini, aminokiseline, polisaharidi, vitamini, alkaloidi, flavonoidi itd., koji su neškodljivi za okoliš, ali su sposobni dati elektron za redukciju Ag^+ u Ag^0. Aktivni sastojci odgovorni za redukciju ovise o organizmu ili ekstraktu koji se koristi. Elektroni bi trebali biti dobiveni dehidratacijom kiselina i alkohola ili keto-enol tautomerijom. Redukcija kompleksa sa srebrovim ionima dovest će do stvaranja atoma srebra, koju slijedi aglomeracija i u konačnici stvaranje i stabilizacija nanočestica srebra (Slika 3.), (Sharma i sur. 2009; Srikar i sur. 2016).



Slika 3. Mehanizam sinteze metalnih nanočestica
(preuzeto i modificirano prema Velusamy i sur, 2015)

2.3.1. Faktori koji utječu na sintezu

Glavni fizički i kemijski parametri koji utječu na sintezu nanočestica srebra su temperatura reakcije, koncentracija metalnih iona, sadržaj ekstrakta, pH reakcijske smjese, dužina reakcije i agitacija. Koncentracija iona, sadržaj ekstrakta i duljina reakcije znatno utječu na veličinu, oblik i morfologiju. Bolju stabilnost nanočestica uzrokuje sinteza koja se provodi u bazičnom mediju koji je odgovoran i za bolji prinos, bolju stopu rasta, jednoličnu disperziju čestica i poboljšan redukcijski proces. Povišenjem pH reakcijske smjese dobivaju se manje i uniformnije čestice sferičnog oblika, no previsok pH se povezuje s nestabilnošću čestica i lošijom aglomeracijom.

Vrijeme miješanja i temperatura također su važni faktori. Pri korištenju biopolimera i ekstrakta, temperature mogu ići i do 100°C, no za mezofilne mikroorganizme temperature ne smiju biti veće od 40°C radi inaktivacije enzima. Povišenje temperature rezultira povećanom stopom sinteze i proizvodnjom manjih čestica, no sinteza se najčešće radi na sobnoj temperaturi.

Veličina čestica ovisi i o porijeklu reducirajućeg agensa. Čestice manje od 50 nm sintetiziraju se upotrebom algi, mahovina, papratnjača, golosjemenjača i biopolimera, a čestice do 100 nm i više upotrebom nekih algi, kritosjemenjača i bakterija. Reakcijska smjesa u kojoj se koriste mikroorganizmi i biopolimeri zahtjeva kontinuirano miješanje radi zaštite aglomeracije, no kod biljnih ekstrakta to nije potrebno. Primjena vanjske mehaničke sile može ubrzati nastanak nanočestica (Srikar i sur., 2016).

3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Srebro je od davnina poznato po svojim antimikrobnim svojstvima. Vremenom je pronašlo primjenu u svakodnevnici, kao i u medicinske svrhe. Još u antičkom dobu srebrno posuđe korišteno je za svakodnevnu uporabu, ali i za pohranu hrane i pića. Do otkrića penicilina srebro je bilo uobičajeno koristiti kao antimikrobni agens. Danas je poznato da srebro djeluje inhibirajuće na preko 650 mikroorganizama od bakterija, gljivica (*Aspergillus, Candida, Saccharomyces*) (Ahmed i sur. 2016) pa sve do virusa HIV (Sharma i sur.).

Rezultati istraživanja daju različite podatke, no na njih mogu utjecati faktori kao što su strukturalne razlike bakterijskih vrsta, veličina i oblik čestica, veličina inokuluma, vrijeme ekspozicije i korišteni medij tijekom analize antibakterijske učinkovitosti. Bitno je napomenuti da srebro inhibira rast i Gram-pozitivnih (*Bacillus cereus, Bacillus lichenifromis, Brevibacterium casei, Lactobacillus fermentum, Staphylococcus aureus, Streptomyces* sp.) i

Gram-negativnih bakterija (*Enterobacter* sp., *Escherichia coli, Ureobacillus thermo sphaerinus*). Odnedavna su nanočestice srebra okupirale mnoge znanstvenike zbog izvanredne obrane od širokog spektra mikroorganizama. Njihova izuzetna svojstva omogućila su primjenu u biomedicini, razvoju lijekova, pročišćavanju vode i zraka (Srikar i sur. 2016).

3.1. Mehanizam antmikrobne aktivnosti

Poznato je da svojstva srebra dolaze od njegovog ioniziranog oblika. Srebro je inertno, no dolaskom u vlažnu okolinu otpušta ione. Svi oblici srebra mogu poslužiti kao izvor iona. Predloženo je da Ag^+ ima sposobnost formiranja kompleksa s nukleinskim kiselinama. Ag^+ ion ulazi u stanicu i interkalira se između parova baza ometajući vodikove veze između DNA lanaca uzrokujući denaturaciju. Ioni srebra također mogu mijenjati trodimenzionalnu strukturu proteina interferirajući s disulfidnim vezama glikoproteinskog/proteinskog sadržaja, čineći ih nefunkcionalnima u mikroorganizmima kao što su bakterije, gljivice i virusi.

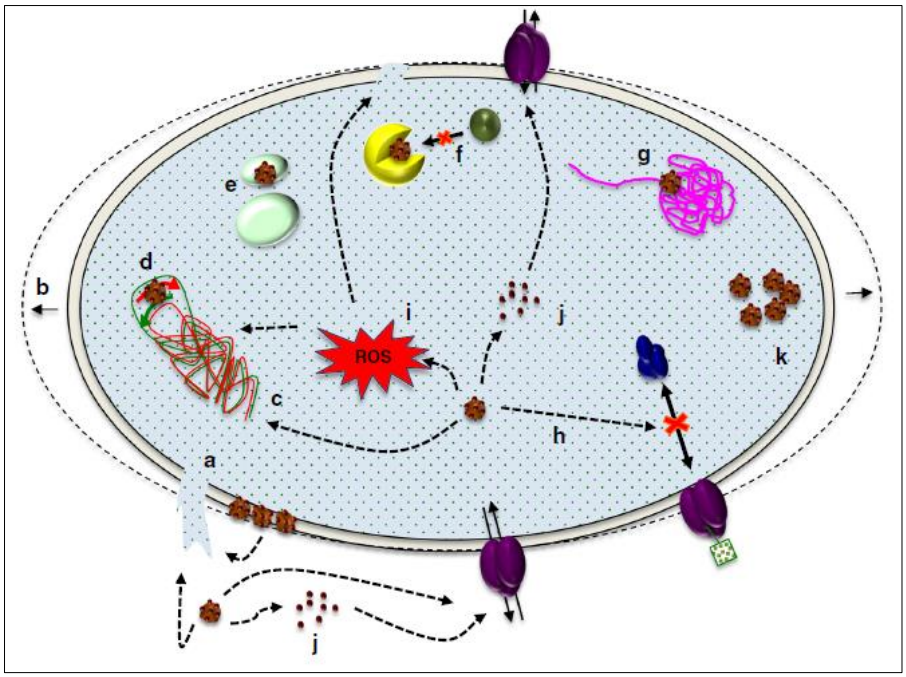
Zbog svoje elektrostatske privlačnosti s bakterijskom stanicom nanočestice srebra smatraju se najprikladnijim baktericidnim agensom (Ahmed i sur., 2016). Neke studije predlažu da bi se nanočestice mogle prihvaćati za površinu stanične membrane i na taj način remetiti staničnu permeabilnost, osmoregulaciju, transport elektrona i respiratornu funkciju (Ibrahim, 2015). Površina *E. coli* je negativno nabijena, stoga Ag^+ ioni lako ostvaruju interakciju sa staničnom membranom (Okafor i sur., 2013). Nanočestice se akumuliraju s vanjske strane membrane, što za posljedicu može imati penetraciju unutar stanice uzrokujući štetu staničnoj stijenci i membrani. Smatra se da se atomi srebra vežu za tiolnu skupinu (-SH) enzima, formirajući stabilnu S-Ag vezu i tako uzrokuju deaktivaciju enzima u staničnoj membrani koji imaju ulogu u proizvodnji energije i transportu iona (Ahmed i sur., 2016).

Gram-pozitivne bakterije su manje osjetljive na Ag^+ nego Gram-negativne. Zbog debele stanične stjenke izgrađene od peptidoglikana (koji se sastoji od linearnih polisaharidnih lanaca povezanih s kratkim peptidima) čine rigidniju strukturu koja je više negativno nabijena i može usporiti djelovanje nanočestica srebra (Ibrahim, 2015). Na *Staphylococus aureus* dokazano je sporije djelovanje nego na Gram-negativnim bakterijama (Okafor i sur., 2013)

Manje čestice srebra imaju bolja baktericidna svojstva. Nanočestice srebra imaju ekstremno veliku površinu za interakciju koja im omogućava bolji kontakt s mikroorganizmima (Ibrahim, 2015).

Drugi predloženi mehanizam opisuje interakciju molekula srebra s biološkim makromolekulama kao što su enzimi i DNA, ali kroz mehanizam oslobađanja elektrona ili

proizvodnjom slobodnih radikala. Inhibicija sinteze stanične stjenke kao i sinteze proteina izazvana je nanočesticama srebra što u konačnici dovodi do curenja ATP-a (Ahmed i sur., 2016).



Slika 3. Model mogućih interakcija nanočestica srebra s bakterijom (Singh i sur. 2015)

Nanočestice srebra (a) prihvaćaju se za staničnu membranu uzrokujući nastanak pora. Iskrivljavanje morfologije stanice (b). Lom dsDNA (c). Inhibicija DNA replikacije (d). Interakcija s 30S ribosomima (e). Inaktivacija vitalnih enzima (f). Denaturacija proteina (g). Modulacija stanične signalizacije (h). Nastanak ROS (i) koji utječu na DNA i staničnu membranu. Otpuštanje srebrovih iona (j) koji utječu na normalnu funkciju membranskih proteina. Akumulacija u letalnim koncentracijama (k).

3.2. Nanočestice srebra u medicini

Otpornost patogena na lijekove postao je ozbiljan problem za javno zdravstvo i pojavila se potreba za razvojem nove razine obrane. Srebro ima dugu povijest upotrebe kao antiseptik i dezinfekcijsko sredstvo, stoga ne čudi da je zbog svojih svojstava pronašlo i nove primjene na ovom području (Ahmed i sur., 2016).

U bolnicama postoji veliki rizik od infekcija koje potencijalno mogu dovesti do smrti pacijenta. Kateteri se prekrivaju s nanočesticama srebra da bi se spriječilo nastajanje biofilma (*Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus* sp., *Candida albicans*). Nanočestice srebra pronašle su svoju kliničku primjenu kao aerosol i uklopljene u polimetilmetakrilat (PMMA) poznatiji kao „*bone cement*“. Također

u kombinaciji s antibioticima kao što su penicilin, amoksicilin, klindamicin i drugi, pojačavaju njihovo antibakterijsko djelovanje (Sharma i sur., 2009). Istraživanje s levofloxacinom na *B. subtilis, S. aureus, P. aeruginosa* i *E. coli* pokazalo je sinergijski učinak antibakterijskog djelovanja (Ibrahim, 2015). *A. baumannii* AIIMS7, koja pokazuje rezistentnost na 10 antibiotika postala je osjetljiva na njih 7 u prisutnosti nanočestica srebra. Ovakve studije su od velike važnosti zbog zabrinjavajuće rezistentnosti bakterija.

Za razliku od antibiotika, nanočestice srebra ne djeluju samo na jedan način već kombinacijom mehanizama kao što su već spomenuto razaranje stanične morfologije, inaktivacija i denaturacija enzima i proteina, utjecaj na strukturu DNA kao i replikaciju, nastanak reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) i oksidativni stres te curenje ATP-a. Također djeluju i na ribosome i moduliranje stanične signalizacije (Slika 3.). Zbog svega navedenog nanočestice su idealne protiv širokog spektra mikroorganizama jer tada mikroorganizmi moraju razviti više mutacija istovremeno radi obrane. Osim što pokazuju sinergijski učinak s antibioticima, smanjuju i samu dozu korištenog antibiotika prilikom terapije. Usprkos svemu, trebalo bi se izbjegavati konstantno izlaganje mikroorganizama nanočesticama jer je studija na *E. coli* ukazala da bi bakterija mogla steći rezistentnost kroz 225 generacija pri konstantnoj izloženosti (Singh i sur. 2015).

3.2.1. Aktivno djelovanje protiv biofilma

Biofilm je struktura koja se sastoji od konzorcija bakterija i matriksa koji te bakterije proizvode, a sadrži proteine, DNA i polisaharide. Biofilmovi su lako adhezivni na površine medicinskih uređaja i uzrokuju kronične infekcije (Singh i sur. 2015). Stanice unutar biofilma se razlikuju od njihovog planktonskog oblika jer biofilm povećava otpornost na terapiju lijekovima, dezinficijense i imuni odgovor domaćina (Kalishwaralal i sur. 2010.). Nanočestice srebra mogu penetrirati kroz biofilm koji je dobra obrana od antibiotika i smanjiti njegovu biomasu, uništiti stanice ili smanjiti njihovu produkciju matriksa (Singh i sur. 2015). Nanočestice srebra koriste se kao komponenta kojom se oblažu i medicinska pomagala kao što je već spomenuti kateter. Nakon inkubacije od 72 h *in vitro* skoro je u potpunosti izbjegnuta formacija biofilma *E.* coli, *S. aureus* i *C. albicans*, a 50 % inhibicije zamijećeno je u slučaju *Enterococcus sp.*, i *P. aeruiginosa* (Markowska i sur. 2013.). Provedeno je istraživanje utjecaja nanočestica srebra na Gram-negativnu bakteriju dobro prilagođenu za rast u vodenom okolišu, *Pseudomonas aeruginosa* i Gram-pozitivnu *Staphylococcus epidermidis,* prisutnu u normalnoj flori kože. Obje bakterije su sposobne za adheziju i stvaranje biofilma na kontaktnim lećama i

kutijicama za njihovu pohranu. Biofilm na lećama produžuje vrijeme kontakta bakterija s okom i na taj način povećava patogenost. Korištenje takvih leća može dovesti do pojave keratitisa, odnosno upale rožnice. Tretiranjem biofilma s koncentracijom nanočestica od 50 nM na 2 h rezultiralo je njegovim smanjenjem za 50 %, a tretiranje sa koncentracijom od 100 nM redukcijom od 95 % i 98 %. Ovi rezultati pokazali su vrlo brzu i efektivnu indukciju smanjene adhezije ovih bakterija nanočesticama srebra (Kalishwaralal i sur. 2010.).

3.2.2. Antibakterijski vodeni filtri

Korištenjem nanočestica srebra u filtraciji vode smanjuje se rizik od oboljenja kao što su dijareja i dehidracija. Nanesene na poliuretansku pjenu pokazale su se stabilne i voda ih nije ispirala. U pokusu s *E. coli* smanjile su količinu bakterije ispod granice detekcije. Studije koje su radile istraživanja na nanočesticama srebra inkorporiranim u ugljične filtere zabilježile su izuzetno letalnu aktivnost za *E. coli, S. cerevisiae* i *P. pastoris* unutar samo nekoliko sekundi. Također su rađene studije na keramičkim filterima impregniranim sa nanočesticama srebra koji su se pokazali kao učinkovita i održiva tehnologija za kućanstava (Sharma i sur. 2009).

3.2.3. Antimikrobni filteri zraka

Bioaerosoli su čestice organskog porijekla koje mogu prouzrokovati akutne i kronične bolesti. Akumuliraju se na ventilacijama, sustavima za grijanje i pročišćavanje zraka s tendencijom akumulacije u uvjetima vlažnosti. Kao filteri često se koriste aktivna ugljikova vlakna no zbog adhezije bakterija i oni vremenom postaju izvor zagađenja bioaerosolima. Filteri inkorporirani s nanočesticama srebra pokazali su se učinkoviti u njihovom uklanjanju (Sharma i sur. 2009).

3.3. Utjecaj na ljude

Razmjerno povećanju upotrebe nanočestica, povećavat će se i broj ljudi koji će im biti izložen. Usprkos očitim prednostima, ostaje otvoreno pitanje utjecaja masovne proizvodnje nanomaterijala u budućnosti. Nanočestice su dovoljno male za penetraciju kroz kožu, u centralni živčani sustav i razne organe ili biti udahnute. Imaju veliku sposobnost taloženja u plućima zdrave osobe, a još veću kod ljudi s kroničnim bolestima respiratornog sustava i astmom. Nakupljanje u plućima može uzrokovati toksičnost zbog njihovih specifičnih svojstava kao što je mali promjer, neobična morfologija, mogućnost degradacije u manje čestice i

biološka aktivnost. Njihovo odlaganje po površini alveola može uzrokovati slabiji odgovor makrofaga. Dok vjerojatno sve može biti toksično u velikim dozama, pitanje je kolika je potencijalno opasna koncentracija nanočestica (Ray i sur. 2009).

Ovisno o materijalu iz kojeg su proizvedene, nanočestice mogu imati različiti utjecaj na zdravlje ljudi. Do sada je utvrđeno da njihovo toksično ili netoksično djelovanje na različite stanice ovisi o njihovoj veličini, koncentraciji i površinskim svojstvima (Okafor i sur. 2013).

Izlaganje plućnih epitelnih stanica metalnim nanočesticama izaziva nastanak reaktivnih kisikovih jedinki (ROS), koje mogu dovesti do oksidativnog stresa i staničnih oštećenja. Istraživanja toksičnosti provedena su na zebricama *Danio rerio* koje su izvrstan model zbog brzog razvoja i transparentnosti tjelesnih struktura. Rezultati su pokazali odlaganje čestica u organima i negativan utjecaj na razvoj. Slični rezultati dobiveni su i tijekom embriogeneze (Sharma i sur. 2009).

Provedeno je istraživanje (Okafor i sur. 2009) o staničnoj toksičnosti nanočestica srebra na embrionalne stanice bubrega čovjeka (HEK293) proizvedenim iz ekstrakta aloe, lišća magnolije i eukaliptusa pri koncentracijama od 2 ppm, 4 ppm i 15 ppm. Dobiveni rezultati ukazuju da biosintetizirane nanočestice u koncentracijama 2-4 ppm nisu toksične za HEK293 stanice no u istoj koncentraciji su toksične za Gram-pozitivne i negativne bakterije. Netoksičnost vjerojatno dolazi od malih koncentracija.

3.3.1. Citotoksičnost kod tumora

Istraživanje je provedeno na stanicama humanog hepatoma (HepG2) *in vitro* pri pet različitih koncentracija (0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 μg/mL). Rezultati su ukazali da je najmanja koncentracija inhibirala rast stanica te linije. Koncentracija od 3,7 μg/mL biosintetiziranih nanočestica srebra rezultirala je smrću 50 % stanica, a najveća koncentracija značajno je inhibirala rast stanica. Rezultati su pokazali da se citotoksičnost povećavala s koncentracijom, a nanočestice sintetizirane pomoću alge *Pterocladiella capillacea* pokazale su se kao obećavajuće i učinkovite po pitanju citotoksičnosti, ali i kao antibakterijski agensi (Kassas i Attia, 2014).

Provedena su i istraživanja na HeLa cervikalnom karcinomu, MDA-MB-231 karcinomu dojke, A549 karcinomu pluća i HEP2 staničnim linijama. Nakon tretmana s bakterijskim nanočesticama srebra stanice raka su se smanjile kao i njihova gustoća, izgubile su integritet membrane, a aktivirala se laktat dehidrogenaza i kaspaza-3. Nanočestice uzrokovale su i

nastanak reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) koje izazivaju apoptozu kancerogenih stanica (Singh i sur. 2015).

4. UTJECAJ NA OKOLIŠ

Očekuje se da će mnoge tehnološke inovacije 21. stoljeća biti povezane s nanotehnologijom. S obzirom na povećanu produkciju i njihovo otpuštanje u okoliš bit će povećano, a njihov utjecaj na ekosustav je problem na kojem se treba raditi. Nužno je razumjeti njihovo ponašanje i sudbinu u ekosustavu.

Nanočestice srebra dospijevaju u okoliš putem nekoliko ruta. Namjerno ili nenamjerno iz proizvodnih jedinica prilikom sinteze, zatim otpuštanjem u atmosferu kao aerosoli, u tekućem ili krutom stanju te prilikom korištenja proizvoda koji ih sadrži kao što su boje, tkanine, kozmetika. Dospijevaju i tijekom reciklaže ili odlaganja ili slučajnim izljevima prilikom transporta. Čestice mogu biti lako prenesene do vodenih sustava putem vjetra ili ispiranjem pomoću kiše, zbog čega postoji potencijal za kontaminaciju tla, podzemnih i površinskih voda (Ray i sur. 2009).

Procjene rizika uključuju izlaganje organizama nanočesticama, ali i mogućnost bioakumulacije koja je uobičajeno uzrok toksičnosti. Rađene su studije na nekim vrstama vodenih organizama gdje su određene koncentracije uzrokovale različite fiziološke posljedice koje bi u konačnici rezultirale smrću. Predlaže se da su veličina i oblik ključni aspekti toksičnosti jer utječu na način ulaska u organizam. O potencijalnom utjecaju na okoliš a posljedično i na ljude naveliko se raspravlja, no s obzirom na povećanu potrebu i proizvodnju nanočestica ovo područje zahtjeva veću pozornost od one koju trenutno ima (Fabrega i sur. 2011).

5. ZAKLJUČAK

Opisano je nekoliko metoda sinteze nanočestica srebra kao alternativa kemijskim i fizičkim postupcima. Najvažnija prednost ovakvih metoda je što nema potrebe za toksičnim kemikalijama prilikom sinteze. Njihovu ulogu preuzimaju bezopasni elementi dobiveni iz prirodnih izvora. Velike prednosti ovakvih postupaka su i financijske uštede.

Srebro ima dugu povijest upotrebe kao antiseptik i dezinfekcijsko sredstvo, a u novije vrijeme intrigira znanstvenike u obliku nanočestica. Prepoznate su mnoge mogućnosti primjene od kojih su od velike važnosti na području medicine. Za razliku od antibiotika, nanočestice srebra ne djeluju samo na jedan način već kombinacijom mehanizama. Pokazale su se dobre u borbi protiv mikroorganizama, ali i u njihovoj prevenciji.

Povećano korištenje nanočestica srebra rezultirati će njihovim sve većim otpuštanjem u okoliš, te je izvjesno kako će se to odraziti na ekosustav i čovjeka.

6. LITERATURA

Ahmed, S. Ahmad, M., Lal Swami , B., Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research* 7:17-28.

Balashanmugan, P., Kalaichelvan, P. T. 2015. Biosynthesis characterization of silver nanoparticles using *Cassia roxburghii* DC. aqueous extract, and coated on cotton cloth for effective antibacterial activity. *International Journal od Nanomedicine* 10(1):87-97.

de Aragao, A. P. et al. 2009. Green synthesisi of silver nanoparticles using the seeweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. *Arabian Journal of chemistry*

El Kassas, H. Y., Attia, A. A. 2014. Bactericidal Application and Cytotoxic Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles with an Extract of the Red Seaweed *Pterocladiella capillaceae* on the HepG2 Cell Line. *Asian Journal of Cancer Prevention* 15(3):1299-1306.

Firdhouse, M. J., Lalitha, P. 2015. Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Application. *Journal of Nanotehnology*

Ibrahim, H. M. M. 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research And Applied Sciences* 8:265-275.

Kalishwaralal K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R. K., Deepak, V., Gurunathan S. 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 79:340–344.

Khalilzadeh, M. A., Borzoo, M. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using onion extract and their application for the preparation of a modified electrode for determination of ascorbic acid. *Journal od food and drug analysis* 24:796-803.

Logeswari, P., Silambarasam, S., Abraham, J. 2015. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society* 19:311-317.

Markowska, K., Grudniak, A. M., Wolska, K. I. 2013. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica* 4:523-530.

Okafor, F., Janen, A., Kukhtareva, T., Edwards , V., Curley, M. 2013. Green Synthesis of Silver nanoparticles, Their Caracterization, Application and Antibacterial Activity. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10:5221-5238.

Ponarulselbam, S., Panneerselvam, C., Murugan, K., Arthi, N., Kalimuthu, K., Thangamani, S. 2012. Synthesis of silver nanoparticles using leavs of *Kataranthus roseus* Linn. G. Don and their antiplasmodial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(7):574-580.

Prabhu, S., Poulose, E. K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effect. *Springer Open Journual* 2:32.

Ray, P. C., Yu, H., Fu, P. P. 2009. Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 27(1):1-35.

Salari, Z., Danafar, F., Dabaghi, S., Ataei, S. A. 2016. Suistainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spyrogira varians* and analysis of their antibacterial activity. *Journal of Saudi Chemical Society* 20:459-464.

Sharma, K. V., Yngard, R. A., Lin Y. 2009. Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145:83-96.

Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhwani, S. A., Chopade, B. A. Bacteriagenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:4579-4593.

Srikar, S. K., Giri, D. D., Pal, D. B., Mishra, P. K., Upadhyay, S. N. 2016. Green Synthesis of Silver nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry* 6:34-56.

Sunkar, S., Nachiyar, C., V. 2012. Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(12):953-959.

Veerasamy, R. et al. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society* 15:113-120.

Velusamy, P. Kumar, G. V., Jeyanthi, V., Das, J., Pachaiappan R. 2016. Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application. *Official Journal od Korean Society of Toxicology* 32(2):95-102.

Wardencki, W., Curylo, J., Namiesnik, J. 2005. Green Chemistry – Current and Future Issues. *Polish Journal of Environmental Studies* 14(4)389-395.