Sinteza i karakterizacija ugljikovih kvantnih točaka iz kore klementine: Ispitivanje čestica na antiradikalnu aktivnost i selektivnost detekcije metalnih iona

Kovačević, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:888875

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Monika Kovačević

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ KORE KLEMENTINE: ISPITIVANJE ČESTICA NA ANTIRADIKALNU AKTIVNOST I SELEKTIVNOST DETEKCIJE METALNIH IONA

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Monika Kovačević

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ KORE KLEMENTINE: ISPITIVANJE ČESTICA NA ANTIRADIKALNU AKTIVNOST I SELEKTIVNOST DETEKCIJE METALNIH IONA

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Komentorica: prof. dr. sc. Stela Jokić

Neposredna voditeljica: Silvija Šafranko, mag. chem.

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ KORE KLEMENTINE: ISPITIVANJE ČESTICA NA ANTIRADIKALNU AKTIVNOST I SELEKTIVNOST DETEKCIJE METALNIH IONA

Monika Kovačević

Rad je izrađen na: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Mentorica: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Sažetak: Ugljikove kvantne točke su relativno nova vrsta fluorescentnih ugljikovih nanomaterijala, koje su zahvaljujući svojim izvanrednim kemijskim i optičkim svojstvima, odličnoj biokompatibilnosti i razmjerno jednostavnoj mogućnosti sinteze, privukle ogromnu pozornost mnogih znanstvenika. Također, zahvaljujući mogućnosti modifikacije površine u svrhu postizanja što boljih svojstava, njihova primjena kao fluorescentnih nanoprobi nije ograničena, dapače, pronašle su svoju primjenu u širokom spektru analiza; u biomedicini, kontroli kvalitete vode i hrane, kontroli okoliša i pesticida. U ovom diplomskom radu, hidrotermalnom sintezom, koristeći liofiliziranu koru klementine kao prekursor i 5 različitih aminokiselina (Leu, Trp, Arg, Ala, His) kao dopante dušika, pripremljene su N-dopirane ugljikove kvantne točke. Sintetiziran je i blank sustav, čisti nedopirani sustav, pripremljeni koristeći samo prekursor kore klementine. Proučavane su razlike između kemijskih, strukturnih, optičkih i bioloških svojstava pripremljenih ugljikovih kvantnih točaka (CQDs). Ugradnja dušika u strukturu CQDs sintetiziranih iz biomase rezultirala je povećanjem kvantnog iskorištenja i poboljšanja svojstava i osjetljivosti dobivenih fluorescentnih nanoproba u usporedbi s blank sustavom. Najbolje kvantno iskorištenje (QY) pokazao je CQD@Arg, QY = 4,59 %. Rezultati su pokazali slična optička svojstva pripremljenih CQDs, a razlike su uočene prilikom selektivne detekcije metalnih iona i ispitivanja na antiradikalnu aktivnost. Najveću antiradikalnu aktivnost pokazao je CQD@Trp, DPPH metodom od 99,85±0,26 %, dok je najbolja vrijednost EC_{50} = 17,94±1,12 μg/mL utvrđena kod blank uzorka. Nadalje N-dopirane CQDs su korištene kao fluorescentne nanoprobe prilikom selektivne detekcije metalnih iona.

Diplomski rad obuhvaća: 76 stranica, 25 slika, 6 tablica, 52 literaturnih navoda i 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ugljikove kvantne točke / CQDs / fluorescentne nanoprobe / kvantno iskorištenje / antiradikalna aktivnost / detekcija metalnih iona

Rad prihvaćen: 22. rujna 2022.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. Izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjednica
2. Prof. dr. sc. Stela Jokić, komentorica i članica
3. Doc. dr. sc. Olivera Galović, član
4. Doc. dr. sc. Anamarija Stanković, mentorica i zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CARBON QUANTUM DOTS FROM CLEMENTINE PEEL: TESTING THE PARTICLES FOR ANTIRADICAL ACTIVITY AND SELECTIVITY OF METAL ION DETECTION

Monika Kovačević

Thesis completed at: Faculty of Food Technology Osijek

Supervisor: Anamarija Stanković, PhD, assistant prof.

Abstract: Carbon quantum dots are a relatively new type of fluorescent carbon nanomaterials, which, thanks to their outstanding chemical and optical properties, excellent biocompatibility and relatively simple synthesis, have attracted the enormous attention of many scientists. Also thanks to the possibility of modifying the surface in order to achieve the best possible properties, their application as fluorescent nanoprobes is not limited, in fact they have found their application in a wide range of analyses; in biomedicine, water and food quality control, environmental and pesticide control. In this thesis, N-doped carbon quantum dots were prepared by hydrothermal synthesis, using lyophilized clementine peel as a precursor and 5 different amino acids (Leu, Trp, Arg, Ala, His) as nitrogen dopants. A blank system, a pure undoped system, prepared using only the precursor, was also synthesized. The differences between the chemical, structural, optical and biological properties of the prepared carbon quantum dots (CQDs) were studied. Incorporation of nitrogen into the structure of carbon quantum dots synthesized from biomass resulted in an increase in quantum yield and improved properties and sensitivity of the obtained fluorescent nanoprobes, compared to the blank system. The best quantum yield (QY) was shown by CQD@Arg, QY = 4.59%. The results showed similar optical properties of the prepared CQDs, and differences were observed during the selective detection of metal ions and testing for antiradical activity. The highest antiradical activity was shown by CQD@Trp, using the DPPH radical removal method of 99.85±0.26%, while the best EC_{50} value = 17.94±1.12 μg/mL was determined for the blank sample. Furthermore, N-doped CQDs were used as fluorescent nanoprobes for the selective detection of metal ions.

Thesis includes: 76 pages, 25 figures, 6 tables, 52 references, 0 appendices

Original in: Croatian

Key words: carbon quantum dots / CQDs / fluorescent nanoprobes / quantum yield / antiradical activity / detection of metal ions

Thesis accepted: 22. 09. 2022.

Reviewers:

1. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, associate professor
2. Stela Jokić, PhD, full professor
3. Olivera Galović, PhD, assistant professor
4. Anamarija Stanković, PhD, assistant professor

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek



Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).

Sadržaj

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Ugljikove kvantne točke – definicija i svojstva 3
2.1.1. Korištenje aminokiselina kao dopanta 7
2.2. Sintetski pristupi za dobivanje različitih CQDs 9
2.2.1. *Top-down* metoda 10
2.2.2 *Bottom-up* metoda 11
2.3. Biomasa kao prekursor za dobivanje CQDs 13
2.3.1. Iskorištenje nusproizvoda prehrambene industrije – kora citrusa 14
3. METODE KARAKTERIZACIJE CQDs 16
3.1. Optička karakterizacija CQDs 16
3.2 Fizikalno-kemijska karakterizacija CQDs 18
3.2.1. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) 18
3.2.2. Zeta potencijal 18
3.2.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) 20
3.2.4 Mikroskopija atomskih sila (AFM) 20
3.2.5. Rendgenska difrakcija na prahu (PXRD) 21
3.2.6. Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija (FTIR) 21
3.2.7. Energetsko-disperzijska rendgenska spektroskopija (EDS) 22
4. PRIMJENA I BIOLOŠKA AKTIVNOST CQDs 23
4.1. *Bioimaging* 23
4.1.1. Antitumorska primjena 26
4.1.2. Antibakterijska primjena 27
4.2. Antioksidacijska aktivnost i njezina važnost u prehrambenoj industriji i biomedicini 28
4.3. Selektivnost i detekcija metalnih iona 31
4.3.1. Detekcija željezovih iona 32
4.3.2. Detekcija živinih iona 33
4.3.3. Detekcija bakrovih iona 35
5. MATERIJALI I METODE 37
5.1. Kemikalije i materijali 37
5.2. Mjerni uređaji i tehnike karakterizacije 37
5.3. Priprema nedopiranih i N-dopiranih CQDs 38
5.4. Kvantno iskorištenje (QY) 40
5.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti 41

5.6. Određivanje selektivnosti i detekcije metalnih iona 42
6. REZULTATI I RASPRAVA 43
6.1. Kemijska i optička karakterizacija dobivenih CQDs 44
6.2. Antiradikalna aktivnost dobivenih CQDs 58
6.3. Selektivnost i detekcija metalnih iona primjenom dobivenih CQDs 61
7. ZAKLJUČAK 63
8. LITERATURA 65
9. ŽIVOTOPIS 68

1. UVOD

Nanomaterijali na bazi ugljika, kao što su fulereni, ugljikove nanocijevi i grafen, privlače pozornost znanstvenika zbog svojih jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava, koja se često razlikuju od izvornog ugljika i njegovih alotropskih modifikacija. Ugljikovi nanomaterijali se na osnovi njihove veličine i morfologije mogu podijeliti u četiri osnovne skupine: nuldimenzionalni (0D), jednodimenzionalni (1D), dvodimenzionalni (2D) i trodimenzionalni (3D) ugljikovi nanomaterijali. Nuldimenzionalne ugljikove nanostrukture su one strukture kod kojih su sve tri dimenzije manje od 100 nm, dok jednodimenzionalne posjeduju bar jednu dimenziju veću od 100 nm [1]. Postoje različiti morfološki oblici nuldimenzionalnih ugljikovih nanomaterijala, ali su među njima najčešće proučavane ugljikove točke. Ugljikove točke (engl. *carbon dots* – CDs) ubrajaju se u opsežno proučavane ugljikove nanomaterijale s vrlo širokim spektrom primjene zahvaljujući svojoj fotoluminescenciji, visokoj fotostabilnosti, niskoj toksičnosti i velikoj biokompatibilnosti. Zahvaljujući različitim dostupnim metodama pripreme ugljikove točke tvore jednu veliku obitelj fluorescentnih nuldimenzionalnih ugljikovih nanomaterijala, stoga se mogu klasificirati prema strukturi ugljične jezgre, koja može biti kristalna ili amorfna, prema površinskim funkcionalnostima i karakteristikama određenih značajki u nekoliko podskupina; grafenske kvantne točke (engl. *Graphene Quantum Dots* – GQDs), ugljikove nanotočke (engl. *Carbon Nanodots* – CNDs), ugljikove kvantne točke (engl. *Carbon Quantum Dots* – CQDs) i karbonizirane polimerne točke (engl. *Carbonized Polymer Dots* – CPDs) [2].

CQDs su nuldimenzionalni ugljikovi nanomaterijali, s promjerima do 10 nm, koji posjeduju ugljičnu jezgru s visokim udjelom sp^3- hibridiziranih ugljikovih atoma i nešto nižim udjelom sp^2-hibridiziranih ugljikovih atoma [3,4]. Bitno je naglasiti da nije isključeno postojanje čestica većih od 10 nm [5]. Površina CQDs može biti funkcionalizirana skupinama kisika, dušika, sumpora ili direktnom ugradnjom heteroatoma u njihovu strukturu. CQDs pokazuju fotoluminescenciju unutarnjeg stanja i kvantne učinke ograničavanja, a različitim se veličinama i funkcionalizacijom površine može podesiti njihova valna duljina fotoluminescencije. Fotoluminescentna svojstva CQDs uzrokuju konjugirane π jedinice i postojanje defekata na površini [3,4].

CQDs mogu se sintetizirati dvjema različitim metodama sinteze; *top-down* i *bottom-up* pristupom. Sinteze se mogu odvijati različitim kemijskim, elektrokemijskim i fizikalnim tehnikama, a CQDs je moguće optimizirati za vrijeme izvođenja sinteze ili naknadnom

obradom. Optimizacija je veoma bitna kako bi se dobila dobra površinska svojstva koja su bitna za daljnju primjenu CQDs. Tako su 2004. godine Xu i sur. otvorili novo poglavlje u ugljičnim nanostrukturama, kada su sasvim neočekivano prilikom procesa pročišćavanja ugljikovih nanocijevi s jednom stijenkom (engl. *Single-wall carbon nanotubes* – SWCNTs) uočili fluorescentne čestice koje su prvotno smatrali međuproduktom. Njihovim otkrićem te daljnjim razvojem metoda sinteze i optimizacije polako su zamijenjene toksične anorganske kvantne točke [3].

Zahvaljujući svojim fotoluminescentnim svojstvima, visokoj biokompatibilnosti, niskoj citotoksičnosti, dobroj topljivosti u vodi, mogućnosti modifikacije površine i relativno jednostavnom načinu sinteze, CQDs se mogu učinkovito primjenjivati u biomedicinskim istraživanjima i u nanotehnologiji općenito [3].

Cilj ovog diplomskog rada je jednostavnom, jeftinom, ekološki-prihvatljivom zelenom sintezom sintetizirati i okarakterizirati CQDs dopirane dušikom. Također, N-dopirane CQDs će biti pripremljene iz biomase, točnije iz liofilizirane kore klementine i pet različitih aminokiselina (Leu, Trp, Arg, Ala, His) te će im biti proučavane razlike u kemijskim, optičkim i strukturnim svojstvima. Daljnji je cilj ovog diplomskog rada ispitivanje sintetiziranih CQDs na antiradikalnu aktivnost i selektivnost detekcije metalnih iona.

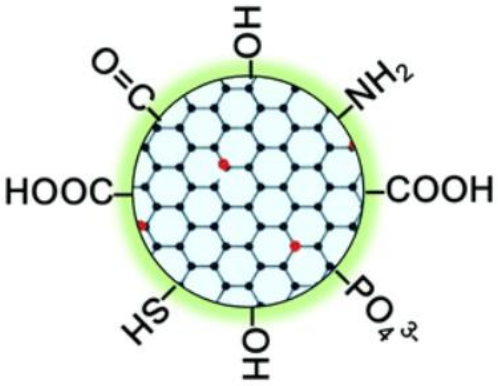
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ugljikove kvantne točke – definicija i svojstva

Ugljikove kvantne točke (engl. *Carbon Quantum Dots* – CQDs) su relativno nova skupina, fluorescentnih kvazi-sferičnih ugljikovih nanomaterijala, čija veličina općenito ne prelazi 10 nm [2]. Ipak sama veličina CQDs nije striktno definirana te se tako u radu Javed-a i O'Carroll-a (2021) spominju CQDs veličine >50 nm. Točnije, Javed i O'Carroll su u svom znanstvenom radu pratili ovisnost veličine CQDs o proteklom vremenu te su tako pomoću slika TEM-a izvjestili kako se prosječna veličina čestica povećala s 23 nm na 63 nm, u vremenskom razdoblju od ~13 mjeseci. Također su uvidjeli da je povećanje čestica brže u prvim tjednima nakon sinteze, a da se s proteklim vremenom smanjuje. Bitno je naglasiti da CQDs nakon završene solvotermalne sinteze nisu filtrirane, ni dijalizirane već su samo centrifugirane te stoga postoji mogućnost prisutnosti nusprodukta reakcije u disperziji. Zaključili su da se sami nusprodukti reakcije polagano vežu na površinu čestica, što rezultira rastom čestica [5].

Za razliku od ugljika koji se općenito smatra kao element s relativno niskom topljivošću u vodi i slabom fotoluminescencijom, CQDs se odlikuju izrazito dobrim kemijskim i optičkim svojstvima. Superiornost CQDs u vidu izvrsnih kemijskih i optičkih svojstava proizlazi iz njihove dobre topljivosti u vodenom mediju, postojane kemijske inertnosti, lake modifikacije površine i visoke otpornosti na fotoizbjeljivanje [6].

Strukturu CQDs tvore ugljikove jezgre s vezanim površinskim funkcionalnim skupinama koje mogu sadržavati kisik, dušik te sumpor [6]. Nastajanje CQDs je nukleacijski proces koji se odvija polaganim rastom ugljikove jezgre i „samopasivizirane" ljuske koja se sastoji od funkcijskih skupina, kao što je prikazano na **Slici 1.**.



Slika 1. *Struktura ugljikove kvantne točke* [4].

Ako promatramo kemijsku strukturu ljuske, ljuska se sastoji od različitih funkcijskih skupina, kao što su skupine na bazi kisika, dušika, sumpor, polimerni lanci, itd., a nastajanje ljuske ovisi o polaznim materijalima koji se koriste i vrstama kojima se dopire [7].

Kako bi se dokazala prisutnost funkcijskih skupina, najčešće se CQDs karakterizira pomoću FTIR (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*), EDS (engl. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) i XPS (engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*) spektroskopije. Također se prisutnost C=C i C=O konjugiranih struktura karakterizira UV-Vis spektroskopijom, a sam sastav vezanih funkcijskih skupina je vrlo bitan u kasnijim procesima funkcionalizacije površine potrebnih za različite daljnje primjene [3].

Nadalje, sama stabilnost suspenzije CQDs je kontrolirana vezanim funkcijskim skupinama, tako se na primjer snaga elektrostatičkog odbijanja između ugljikovih kvantnih točaka može utvrditi pomoću površinskog zeta potencijala. Točnije, sama vrijednost zeta potencijala nam daje uvid u to radi li se o kratkotrajnoj ili dugotrajnoj stabilnosti suspenzija. CQDs suspenzije s visokom vrijednošću zeta potencijala (negativnom ili pozitivnom) se smatraju elektrostatski stabilnijima, dok se suspenzije s niskom vrijednošću (oko nule) smatraju manje stabilnima. CQDs s niskim zeta potencijalom imaju međusobna manja elektrostatska odbijanja zbog kojih dolazi do lakše agregacije ili koagulacije tijekom kraćeg vremenskog perioda. Dok kod CQDs s visokim zeta potencijalom, odbojne sile nadmašuju privlačne sile što rezultira postojanjem relativno stabilnih sustava [8].

Zahvaljujući dosadašnjim istraživanjima postoje dvije teorije o vrsti jezgre CQDs, jedna je grafitna kristalna, a druga amorfna jezgra, a koja će vrsta jezgre prevladati ovisi o prisutnosti sp^2-hibridiziranih atoma u jezgri. Jezgre u svom sastavu sadrže uglavnom sp^3-hibridizirane ugljikove atome i nešto manje sp^2-hibridiziranih ugljikovih atoma. Grafitna kristalna jezgra je opisana kao sferična struktura promjera 2-3 nm s razmakom između rešetaka od ~0,2 nm i ona u svom sastavu sadrži sp^2-hibridizirane atome. S druge strane amorfna jezgra posjeduje niži stupanj kristaličnosti, što je posljedica manjeg sadržaja sp^2-hibridiziranih ugljikovih atoma i prisutnosti većeg broja defekata na površini čestice [9].

Bitno je spomenuti da većina znanstvenih istraživanja navodi da CQDs posjeduju amorfnu jezgru, [10,11], stoga se može reći da su kristalne rešetke CQDs relevantne onima amorfnog ugljika i grafita. Međutim, ta teorija proizlazi iz različitih tehnika karakterizacije kao što su NMR (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*), XRD (engl. *X-Ray Diffraction*), TEM (engl.

Transmission electron microscopy), Ramanova spektroskopija i XPS te do sada zapravo nema izravnih vidljivih rezultata koji daju uvid u točnu strukturu CQDs [3,9].

Glavni faktori koji utječu na svojstva CQDs su; veličina čestica, prisutnost defekata na površini, prijelaz pojasnog razmaka i površinska funkcionalizacija, odnosno prisutnost funkcijskih skupina na površini čestica ili dopiranje heteroatomima [12]. Smatra se da je struktura površine CQDs najbitnija karakteristika za objašnjenje fotoluminescencije CQDs. Površinska su stanja CQDs uglavnom izazvana površinskom oksidacijom CQDs, što može uzrokovati defekte na površini CQDs i samim time može dovesti do promjene njihovih fotoluminescentnih svojstava. Povećanjem stupnja površinske oksidacije CQDs, dolazi do povećanog nastanka defekata na površini, sve kako bi se uhvatilo više eksitona, a na taj način povećanje veličine CQDs rezultira pomakom valne duljine emisije fluorescencije prema crvenom dijelu spektra vidljive svjetlosti (engl. *red shift*), što odgovara valnim duljinama većim od 650 nm [9]. Također i prisutnost funkcionalnih skupina na površini CQDs može imati ključan utjecaj na njihova fluorescentna svojstva. Površinska modifikacija CQDs može povećati intenzitet fotoluminescencije, promijeniti valnu duljinu emisije, suziti širinu pika fluorescencije i poboljšati topljivost u vodi [6].

Dopiranje heteroatomima radi poboljšanja svojstava CQDs česta je praksa prilikom njihove sinteze. Uvođenjem heteroatoma u strukturu amorfnih ugljikovih jezgara moguće je uspješno kontrolirati optička svojstva, a samim time i kemijska svojstva na površini i unutrašnjosti strukture. Prilikom dopiranja heteroatomima, najčešće se kao dopant koristi dušik budući da mu je veličina atoma slična ugljikovoj i da je veće elektronegativnosti od ugljika i na taj se način vrlo uspješno ugrađuje u strukturu CQDs [12].

Budući da se CQDs mogu lako dopirati i ostalim heteroatomima kao što su kisik, sumpor i fosfor, to rezultira povećanjem topljivosti i jednostavnošću površinske funkcionalizacije. Također atomi koji su prisutni u različitim funkcijskim skupinama poput; vodika, kisika, dušika, poboljšavaju disperziju CQDs u vodi te samim time olakšavaju daljnju funkcionalizaciju i površinsku pasivizaciju s različitim organskim, anorganskim i biološkim tvarima [13].

Heteroatomi se uvode u strukturu „golih“ odnosno nedopiranih CQDs koristeći različite metode koje se mogu odviti putem jednog ili kombinacijom više koraka. Iako je prethodno spomenuto samo nekoliko heteroatoma koji se najčešće koriste prilikom dopiranja, dopanti mogu biti i nemetalni i metalni. John i sur. (2021) u svom radu daju literaturni pregled nekoliko dotadašnjih

objavljenih radova koji koriste različite dopante; B, La, Si, Gd, Yb, Eu, Se, Tb, Nd, F, Cl, Cu. Također, navode kako su korišteni dopanti sposobni za poboljšanje intenziteta fluorescencije, podešavanjem pojasnog razmaka i uvođenjem novih energentskih razina. Korištenjem nemetalnih dopanta dolazi do povećanja kvantnog iskorištenja, budući da se pojasni razmak između π orbitale i nevezujuće (n) orbitale ugljika, smanjuje. Dok se korištenjem metalnih dopanata struktura pojasnog razmaka prilagođava keliranjem na funkcionalne skupine u prekursorima tijekom karbonizacije ili dehidracije [13].

Kao što je već prethodno spomenuto, CQDs posjeduju ugljikovu jezgru i ljusku, a slojevi ljuske su zasićeni vodikovim atomima. Sama površina CQDs je podložna kontaminaciji vrstama prisutnima u svom okruženju, a čak i samo mali udio kontaminanata može utjecati na promjenu optičkih svojstava CQDs-a. Kako bi se spriječila kontaminacija površine CQDs, a samim time i smanjio rizik od štetnog učinka na optička svojstva, najbolja strategija je pasivizacija površine CQDs. Kako bi se uspješno primijenio postupak pasivizacije površine prvotno je potrebno površinu CQDs izložiti utjecaju kiselog medija, kako bi se olakšalo vezanje funkcionalnim ligandima. Najčešće se primjenjuje oksidacija jakim kiselinama budući da je to najjednostavniji i najučinkovitiji način uvođenja karbonilnih i karboksilnih skupina koje svojom prisutnošću olakšavaju i povećavaju topljivost CQDs u vodenom mediju [13].

Kvantno iskorištenje (engl. *quantum yield* – QY) fluorescencije nemodificiranih CQDs općenito ima vrlo niske vrijednosti [9]. Često se funkcionalizacija površine CQDs upotrebljava za poboljšanje intenziteta emisije fluorescencije, kako bi se unaprijedila njihova primjena u biomedicinskim i farmaceutskim analizama. Funkcionalni ligandi poput PEG-a, DNA molekula, proteina i organskih molekula teže međusobnom umrežavanju na površini CQDs, a takvo umrežavanje daje bolja optička svojstva [13].

Funkcionalizacija površine može uspješno smanjiti defekte na površini CQDs i povećati vjerojatnost rekombinacije eksitona, što će rezultirati onemogućavanjem aglomeriranja CQDs i pojačavanjem intenziteta fluorescencije. Postoje dva osnovna načina površinske pasivizacije CQDs; 1. zatvaranje nemodificiranih CQDs nekim dugolančanim molekulama, 2. oksidiranje površine CQDs jakim kiselinama [12]. Prilikom sinteze CQDs iz biomase, karbonizacija i pasivizacija se odvijaju istovremeno, budući da su u biomasi prisutne dugolančane karboksilne kiseline i neke druge tvari koje posjeduju hidroksilne, aminske, karboksilne ili tiolne skupine. Zbog prisutnosti navedenih funkcijskih skupina moguće je samopasiviranje CQDs sintetiziranih iz biomase, a rezultat samopasiviranja je vidljiv u poboljšanju kvantnog iskorištenja i boljim optičkim svojstvima [4,12].

2.1.1. Korištenje aminokiselina kao dopanta

Kao što je već prethodno spomenuto, CQDs mogu biti modificirane u svrhu poboljšanja optičkih svojstava, stoga im se površina najčešće funkcionalizira karboksilnim i hidroksilnim skupinama, ali budući da je dokazano postojanje olakšane interakcije s biološkim materijalima i poboljšanje kvantnog iskorištenja sve se više prilikom funkcionalizacije koriste amino skupine, a nerijetko i funkcionalne skupine koje u svom sastavu sadrže sumpor, poput: C-S, -C-S-C-, C=S [6].

Prilikom izrade ovog diplomskog rada korištene su aminokiseline, kao dopanti za nastajanje N-dopiranih CQDs.

Aminokiseline su organske molekule koje se sastoje od centralnog ugljikovog atoma, poznatijeg kao α-ugljikov atom, na kojeg su vezane amino skupina ($-NH_2$), karboksilna skupina (-COOH), atom vodika i određena R skupina. Skupina R poznatija je u literaturi pod imenom bočni ogranak. Aminokiseline su zwitterioni, odnosno ponašaju se kao dipolarni ioni kad se nalaze u području neutralne pH-vrijednosti, na taj je način amino skupina protonirana ($-NH_3^+$), dok je karboksilna skupina deprotonirana ($-COO^-$). Promjenom pH-vrijednosti mijenja se ionizacijsko stanje aminokiselina, tako je na primjer u kiselom mediju pri pH vrijednosti (pH = 1) amino skupina protonirana ($-NH_3^+$), a karboksilna skupina nije izgubila proton (-COOH). Porastom pH vrijednosti karboksilna skupina gubi proton budući da je njena pKa oko 2. Nadalje dipolarni oblik aminokiseline prevladava sve do pH vrijednosti 9, nakon čega protonirana amino skupina gubi proton [14].

Proteinogene aminokiseline izgrađuju proteine, poznato ih je 20, međusobno se razlikuju prema bočnim ograncima, a svaki bočni ogranak ima različit oblik, naboj, sposobost stvaranja vodikovih veza, hidrofobnost i kemijsku reaktivnost [14].

U izradi ovog diplomskog rada korištene su aminokiseline; leucin, triptofan, arginin, alanin i histidin, a njihove strukture, pKa vrijednosti i izoelektrične točke su navedene u **Tablici 1.**.

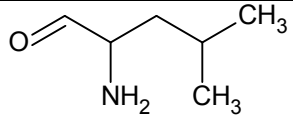
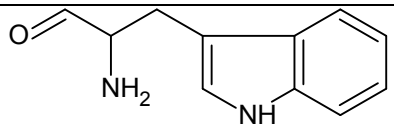
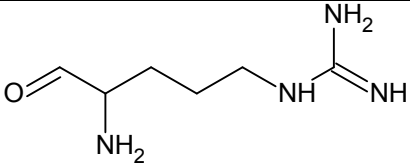
Alanin (Ala, A) je druga najjednostavnija aminokiselina (nakon glicina) i kao bočni ogranak posjeduje metilnu skupinu ($-CH_3$). To je nepolarna hidrofobna aminokiselina koja svojim hidrofobnim učinkom stabilizira trodimenzionalnu strukturu proteina topljivih u vodi, na način da se želi zbližiti s ostalim bočnim ograncima u strukturi proteina, a pri tome izbjeći vodu. Neesecijalna je aminokiselina, a ljudski organizam može je sintetizirati iz pirogrožđane kiseline, stoga ju nije potrebno izravno unositi hranom [14,15].

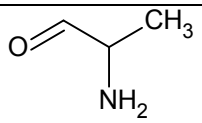
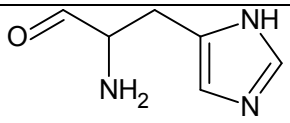
Leucin (Leu, L) je hidrofobna aminokiselina koja posjeduje razgranati alifatski bočni ogranak, on također stabilizira trodimenzionalnu strukturu proteina topljivih u vodi svojim hidrofobnim učinkom. Odlika aminokiselina s razgranatim bočnim je mogućnost slaganja u kompaktne strukture pri tome ostavljajući vrlo malo slobodnog prostora. Esecijalna je aminokiselina, stoga ju ljudi i životinje moraju unositi prehranom, dok biljke i mikoorganizmi imaju mogućnost sinteze iz pirogrožđane kiseline [14,15].

Triptofan (Trp, W) je aminokiselina s aromatskim bočnim ogrankom, kojeg čini indolska skupina vezana na metilensku skupinu; indolska skupina je biciklička struktura koja se sastoji od benzenskog prstena spojenog s pirolom. Triptofan je i hidrofobna i hidrofilna molekula, zato što u svojoj strukturi ima -OH i -NH- skupine. Esencijalna je aminokiselina i tijelo ga koristi kao prekursor za sintezu serotonina i niacina [14,15].

Arginin (Arg, R) je veoma hidrofilna aminokiselina dugog bazičnog bočnog ogranka, s pozitivno nabijenom gvanidinijskom skupinom na kraju bočnog ogranka pri neutralnom pH. Arginin je optimalno oblikovan za vezanje fosfatnog aniona stoga se često može naći u aktivnim mjestima enzima koji vežu fosfatne supstrate. Neesecijalna je aminokiselina za odrasle sisavce, koji ga mogu sintetizirati iz glutaminske kiseline, uz to sudjeluje i u ciklusu uree; metaboličkom putu kojim se uklanja amonijak iz organizma sisavaca [14,15].

Tablica 1. Prikaz korištenih aminokiselina u izradi ovog rada, njihovih struktura, pKa vrijednosti i izoelektričnih točaka [14].

Ime i kratica	**Struktura**	**pKa C_α-COOH**	**pKa C_α-NH_3^+**	**pKa bočnog lanca**	**Izoelektri-čna točka (pI)**
leucin Leu		2,36	9,60	-	5,98
triptofan Trp		2,43	9,44	-	5,94
arginin Arg		2,17	9,04	12,48	10,76

alanin Ala		2,34	9,69	-	6,02
histidin His		1,82	9,17	6,00	7,59

2.2. Sintetski pristupi za dobivanje različitih CQDs

CQDs su otkrivene sasvim slučajno, 2004. godine kada je Xu sa svojim suradnicima po završetku procesa pročišćavanja ugljikovih nanocijevčica s jednom stijenkom (engl. *Single-wall carbon nanotubes* – SWCNTs) uočio fluorescirajući međuprodukt. Naime, Xu i sur. (2004) su u svom radu opisali elektroforetsku metodu za pročišćavanje ugljikovih nanocijevčica s jednom stijenkom, dobivenih pražnjenjem plazma lukom iz čađe. Zahvaljujući njihovom istraživanju na čađi, točnije na SWCNTs uspješno su izolirane dvije nove vrste ugljikovih nanomaterijala; kratki cjevasti ugljik (engl. *short tubular carbon* – STC) i mješavina fluorescentnih nanočestica [16]. Daljnjom analizom je utvrđeno da su Xu i sur. (2004) metodom pražnjenja plazma lukom potpuno neočekivano dobili čak 3 tipa CQDs s razlikom u relativnim molekularnim masama i svojstvima fluorescencije. Dobivene su CQDs pri valnoj duljini od 365 nm emitirale plavo-zelenu, žutu i narančastu fluorescenciju. Također su uočili prisutnost hidrofilnih karboksilnih skupina koje su se vezale na površinu CQDs. Dobivene CQDs su se odlikovale dobrom topljivošću u vodi i unatoč što prilikom postupka lučnog pražnjenja nastaju čestice različitih veličina, dobivene CQDs su posjedovale dobru raspodjelu veličine čestica [16].

Nakon njihovog otkrića pokrenut je niz novih istraživanja kako bi se što bolje istražila i iskoristila njihova fluorescentna svojstva. Dvije godine kasnije (2006. godine), Sun i sur. objavljuju rad u kojem karakteriziraju CQDs kao snažno fotoluminescentne čestice i u suspenziji i u čvrstom stanju, pripremljene nakon jednostavne površinske pasivizacije. Također navode kako je emisija luminescencije CQDs stabilna na fotoizbjeljivanje i ne dolazi do efekta treptanja. Sun i sur. (2006) su uspjeli sintetizirati CQDs laserskom ablacijom ugljika (ugljične mete) u prisutnosti vodene pare s argonom kao plinom nosačem. Ugljična meta je pripremljena vrućim prešanjem smjese grafitnog praha i cementa te je postupno pečena, sušena i žarena u struji argona uz prisutnosti vodene pare pri 900 °C i 75 kPa. Nakon sinteze određena je veličina čestica i uzorak je podvrgnut na fotoluminescencijsku detekciju. Raspored veličine čestica pokazao je prisutnost agregata različitih nanorazmijera, a fotoluminescencija uzorka i njegove

suspenzije nije detektirana. Dodatnom modifikacijom sintetiziranog uzorka pomoću dušične kiseline (HNO_3) i površinskom pasivizacijom pomoću organskih molekula kao što su PEG_{1500N} (polietilen-glikol) i PPEI-EI (polimer) dobivene su fotoluminescentne čestice postojane i u suspenziji i u čvrstome stanju, a njihova emisija pokriva područje UV svjetlosti, vidljive svjetlosti i područje blisko infracrvenoj svjetlosti [3,17]. Stoga se sinteza CQDs laserskom ablacijom koju su proveli Sun i sur. (2006) smatra prvom poznatom sintezom.

Što se tiče ostalih metoda sinteze CQDs, posljednjih desetak godina predložene su brojne metode sinteze, a one se ugrubo mogu podijeliti u dvije skupine; „*top-down*“ i „*bottom-up*“. *Top-down* i *bottom-up* metode se mogu odvijati različitim kemijskim, elektrokemijskim i fizikalnim postupcima. Bitno je naglasiti da je prednost tih sintetskih metoda mogućnost modifikacije CQDs za vrijeme pripreme ili nakon sinteze, a nedostatak mogućnost agregacije ugljika prilikom karbonizacije [6].

2.2.1. *Top-down* metoda

Top-down metoda je metoda kojom se makroskopske ugljične strukture (grafitni prah, čađa, aktivni ugljen, ugljične nanocijevi, karbonska vlakna) smanjuju do nano veličina, postupcima kao što su; laserska ablacija, ultrazvučna sinteza, kemijska oksidacija, elektrokemijska oksidacija te pražnjenje plazma lukom [7,18].

Kemijska oksidacija je jedna od *top-down* metoda priprave CQDs, koja zahtjeva korištenje jakih oksidansa kao što su; sumporna kiselina, dušična kiselina i vodikov peroksid [16]. Metodom kemijske oksidacije Ray i sur. (2009) sintetizirali su fluorescentne ugljikove nanočestice koristeći 5 M dušičnu kiselinu i čađu iz upaljene svijeće. Oksidacijom ugljične čađe dušičnom kiselinom uz refluksiranje pri 100 °C tijekom 6 h, 12 h, 18 h, dobivene su fluorescentne ugljikove nanočestice veličine 2-6 nm s kvantnim iskorištenjem od ~ 3 %. Ray i sur. (2009) uspješno su modificirali metodu sinteze, prvo odvojivši male i fluorescentne čestice ugljika iz heterogene smjese, zatim budući da su male čestice više fluorescentne od većih omogućili su bolju izolaciju manjih čestica i rast kvantnog iskorištenja do ~ 3 % (u odnosu na prethodna istraživanja i kvantno iskorištenje < 0,1 %). Budući da je ugljična čađa hidrofobna i netopiva u vodi, refluksiranjem s dušičnom kiselinom i ugradnjom atoma dušika i kisika u čestice čađe nastaju čestice manjih veličina, dobro topljive u vodi s najvećim intenzitetom fluorescencije pri valnoj duljini pobude od 450 nm i maksimumom emisije na 520 nm što odgovara zelenoj boji. Naposljetku, dobivene su fluorescentne ugljikove nanočestice koje su

imale mogućnost ulaska u stanice bez postfunkcionalizacije površine i mogle su se koristiti pri oslikavanju stanica zahvaljujući svojim fluorescentnim svojstvima [18,19].

Metodom elektrokemijske oksidacije Liu i sur. (2016) uspjeli su sintetizirali CQDs s prosječnom veličinom čestica promjera (4,0 ± 0,2) nm i s kristaličnošću visokog stupnja. Elektrokemijski sustav za sintezu CQDs se sastojao od grafitne – radne elektrode, Ag/AgCl – referentne elektrode, platinske folije – protuelektrode, a kao elektrolit se koristila smjesa; etanol, voda i natrijev hidroksid. Provođenjem stalnog potencijala od 5 V tijekom 3 sata u atmosferi dušika, na grafitnu radnu elektrodu, dobivene su monodisperzne CQDs. Zanimljivo je to da je dobivena disperzija CQDs bila bezbojna i skladištenjem pri temperaturi 4 °C ostaje bezbojna no pohranom na sobnoj temperaturi postupno je došlo do promijene boje u svijetlo žutu. Primjenom UV-Vis spektroskopije, spektrofluorometrije, rendgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS), FTIR spektroskopije i transmisijske elektronske mikroskopije visoke rezolucije (HRTEM), utvrđeno da je promjena boje posljedica oksidacije površinskih čestica tijekom izlaganja svjetlosti i sobnoj temperaturi. Nadalje praktična primjena sintetiziranih CQDs ispitana je detekcijom Fe^{3+} iona (feri iona) na uzorku vode za piće, sa širokim linearnim rasponima koncentracija od 10 - 200 μM i relativno niskom granicom detekcije od 1,8 μM. Također zahvaljujući vrlo dobrim karakteristikama niske citotoksičnosti i odlične biokompatibilnosti pri 200 μg/mL s preživljavanjem stanica >80 %, sintetizirane CQDs su uspješno primijenjene i za oslikavanje stanica (engl. *bioimaging*) [3,20].

Prednosti *top-down* metoda su; jednostavna priprema, jeftine sirovine, mogućnost masovne proizvodnje, ali nedostatci su; dugotrajan proces pripreme i obrade čestica koji zahtjeva teške uvjete sinteze (jake kiseline ili oksidacijska sredstva), a samim time i poprilično skupu opremu i materijale. Stoga su *top-down* metode pogodne za masovnu industrijsku proizvodnju [7,18].

2.2.2 *Bottom-up* metoda

S druge strane, *bottom-up* metoda podrazumijeva polimerizaciju molekularnih prekursora (glukoza, limunska kiselina, saharoza, aminokiseline, biomasa) postupcima kao što su; hidrotermalna sinteza, mikrovalna sinteza, termalna razgradnja, tretiranje plazmom, metode pražnjenja i izgaranja [7,18].

Zahvaljujući mogućnosti većeg izbora kemijskih prekursora i upotrebi optimalnih radnih uvjeta *bottom-up* metode se smatraju boljim odabirom za sintezu CQDs. Također, još jedna od prednosti *bottom-up* metoda je mogućnost poboljšane kontrole nad veličinom čestica,

morfologijom i kemijskim sastavom. Nadalje, mogućnost primjene različitih organskih prekursora ugljika uzrokuje promjenjivost svojstava CQDs, a samim time se proširuje raspon mogućih primjena u različitim istraživačkim područjima. Brojnim znanstvenim istraživanjima potvrđeno je da mogućnošću modifikacije površine čestica tijekom ili nakon sinteze, odnosno funkcionalizacijom površine i dopiranjem različitim heteroatomima, moguće je poboljšati kemijska i fizikalna svojstva sintetiziranih CQDs, a samim time i utjecati na kvantno iskorištenje. Također bi funkcionalizacija površine i dopiranje različitim heteroatomima imalo pozitivan učinak na optička svojstva, površinsku reaktivnost, a samim time i na selektivnost detekcije metalnih iona i antiradikalnu aktivnost. Najčešće se za funkcionalizaciju površine koriste karboksilne i hidroksilne skupine, dok se kao dopanti koriste dušik, sumpor i fosfor [18].

Hidrotermalna sinteza, mikrovalna sinteza i termalna razgradnja najčešće su opisane metode za pripremu CQDs zahvaljujući jednostavnosti, korištenju širokog izbora prekursora ugljika, mogućnosti funkcionalizacije površine, ekološke prihvatljivosti i niskih troškova [6].

Liu i sur. (2014) pripravili su CQDs mikrovalnom sintezom unutar jedne minute koristeći saharozu kao prekursor ugljika i dietilen glikol (DEG) kao reakcijski medij. DEG-stabilizirane CQDs imale su usku distribuciju veličine čestica s prosječnim promjerom oko 5 nm i bezbojnu disperziju prilikom izlaganja dnevnom svjetlu, dok su prilikom izlaganja valnoj duljini pobude od 360 nm, emitirali zelenu luminescenciju. Primjenjivost sintetiziranih CQDs testirana je na *bioimaging* zahvaljujući niskoj citotoksičnosti do 1 mg/mL i visokom preživljavanju stanica [6,21].

Ekološki prihvatljivom, jeftinom zelenom sintezom Lai i sur. (2020) pripravili su CQDs hidrotermalnom sintezom iz svježe cherry rajčice bez ikakvih drugih reagensa uz uvjete sinteze od 6 sati pri temperaturi od 180 °C. Kvantno iskorištenje je iznosilo 9,7 %, a prosječna veličina čestica je bila oko 7 nm. Primjenjivost sintetiziranih CQDs analizirana je na detekciju herbicida – trifluralina (linearni raspon koncentracije od 0,050 – 200 μM i granica detekcije; LOD = 0,5 nM). Sintetiziranim CQDs ispitana je ovisnost intenziteta fluorescencije o pH, utvrđeno je da su intenziteti fluorescencije stabilni u širokom rasponu pH od 2 – 11, što dovodi do zaključka da su sintetizirane CQDs pogodne za analize prirodnih uzoraka kao što su uzorci tla i vode za piće. Također su utvrdili da sintetizirane CQDs posjeduju odličnu fotostabilnost budući da tijekom izloženosti stalnoj emisiji pri λ = 365 nm u trajanju od sat vremena nije došlo do smanjenja intenziteta fluorescencije. Osim toga promjena intenziteta fluorescencije bila je zanemarivo mala s obzirom da su CQDs skladištene 6 tjedana pri sobnoj temperaturi, stoga je njihova fotostabilnost dovoljno dobra za daljnju praktičnu primjenu, u ovom slučaju kao

detektora trifluralina. Pripremljene su CQDs pokazale visoki selektivni odgovor na trifluralin u odnosu na druge herbicide, a uspješno su primijenjene i na detekciju trifluralina u realnim uzorcima tla [22].

2.3. Biomasa kao prekursor za dobivanje CQDs

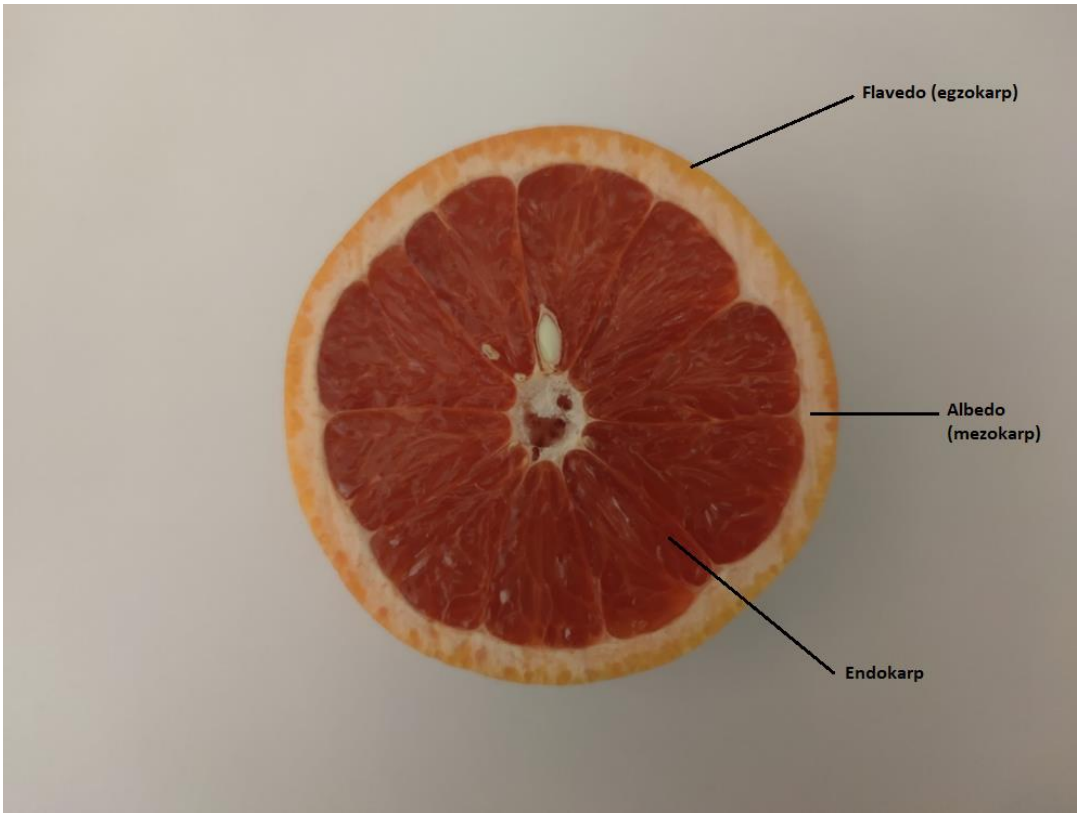
Prije otkrića CQDs interes mnogih znanstvenika koji se bave nanomaterijalima bio je usmjeren na anorganske kvantne točke zahvaljujući njihovoj odličnoj fotostabilnosti, dobrim kemijskim i optičkim svojstvima te elektroničkoj i katalitičkoj aktivnosti. Navedena svojstva omogućila su širok spektar primjene ovih poluvodičkih materijala u raznim istraživačkim poljima, ponajviše u razvoju nanotehnologije i u biomedicinskim istraživanjima. Međutim, potencijalni problemi u biomedicinskoj primjeni su njihova citotoksičnost i niska biokompatibilnost, budući da su anorganske kvantne točke poluvodičke čestice, točnije poluvodički nanokristali koji u svom sastavu najčešće sadrže teške metale (kadmij, olovo, indij) i spojeve na bazi teških metala poput: CdS, CdSe, CdTe, PbS, PbSe, InAs, InP. Odlična zamjena toksičnim anorganskim kvantnim točkama zasigurno su ugljikove kvantne točke, netoksični biokompatibilni fluorescenti nanomaterijali koji se mogu koristiti u biomedicinskim i farmaceutskim istraživanjima. Biokompatibilnost i niska citotoksičnost od ključne su važnosti prilikom primjene u biomedicinskim i farmaceutskim istraživanjima kao što su; stanično oslikavanje, isporuka lijekova, teranostičke primjene i biosenzori, a brojni znanstveni radovi potvrđuju tu tvrdnju. Također, noviji znanstveni radovi pokazuju kako se CQDs mogu učinkovito pripraviti iz biomase. Stoga se biomasa može smatrati dobrim izvorom ugljika, a samo korištenje prirodnih izvora za sintezu CQDs omogućuje jednostavno dopiranje heteroatomima koji su prirodno prisutni u biomasi [3,18].

Biomasa je složena, heterogena, biorazgradiva i bioorganska tvar koja se može dobiti iz raznih izvora, a najčešće se dobiva iz kućnog, poljoprivrednog i industrijskog otpada [12]. Biomasa je prirodni organski izvor ugljika te se uglavnom sastoji od celuloze, hemiceluloze, lignina, pepela i proteina. Na primjer, sastav otpada biljne mase čini; 30-60 % celuloza, 20-40 % hemiceluloza, 15-25 % lignin [12]. Biomasa je obnovljivi, ekološki prihvatljivi, jeftini, lako dostupni i netoksični izvori ugljika za proizvodnju CQDs. Nažalost, velik problem je to što se većina otpadne biomase odbacuje, tj. masovno odlaže na odlagališta ili spaljuje na otvorenom, što ne samo da dovodi do rasipanja resursa, već i uzrokuje određene ekološke probleme koji mogu naštetiti ljudskom zdravlju, a dugoročno i zdravlju čitave biosfere. Stoga su pokušaji

znanstvenika da se otpadna biomasa iskoristi kao prekursor u proizvodnji CQDs ekološki i ekonomski isplative metode kojima je cilj iskorištenje sirovine i dobivanje proizvoda visoke kvalitete [3,12].

2.3.1. Iskorištenje nusproizvoda prehrambene industrije – kora citrusa

Citrusno voće ili agrumi, pripadaju porodici *Rutaceae*, koja broji oko 140 rodova i 1300 vrsta. Važnije sorte koje se uzgajaju u komercijalne svrhe su; naranče, mandarine, limeta i limun, grejp, klementine, itd.. Općenito sve vrste citrusa posjeduju sličan izgled i anatomiju, a **Slika 2.** prikazuje presjek citrusa, točnije prikazana je anatomija citrusa. Plod citrusa čini sočno meso obavijeno korom. Iz **Slike 2.** vidljivo je da se kora citrusa sastoji od dva dijela: vanjskog – flaveda ili egzokarpa i unutarnjeg – albeda ili mezokarpa, dok unutarnji dio ploda čini endokarp, odnosno sočni mesnati dio ploda koji može sadržavati sjemenke [23,24].



Slika 2. *Prikaz anatomije citrusa* [autor prema [24]].

Citrusi se najčešće koriste za proizvodnju sokova i eteričnih ulja, a u manjoj mjeri i za proizvodnju dehidriranih proizvoda od citrusa, marmelada, džemova i aroma za piće. Smatra se

da se čak 50-60 % mase preostalog voća nakon prerade pretvara u otpad od citrusa, a otpad čine kora, sjemenke i ostatci membrane. Procjenjuje se da prerađivačka industrija citrusa godišnje stvara preko 60 milijuna tona otpada u cijelom svijetu, stoga je količina polučvrstog i čvrstog otpada citrusa koji nastaje, ogromna [23].

Objavljeno je nekoliko znanstvenih radova koji izvještavaju da bioaktivne molekule dobivene iz otpada citrusa posjeduju antimikrobna, antialergijska, antikancerogena i antidijabetička svojstva te se kao takve preporučuju kao dodatci prehrani. Otpad citrusa čine polukruti ostatci, koji se sastoje od zaostalih membrana endokarpa, vezikula, ostataka srži i velikim dijelom od albeda i flaveda. Također ukupni sastav otpada citrusa ovisi o vrsti citrusa, sorti i o vremenu i uvjetima berbe. Otpad citrusa bogat je šećerima, vlaknima, organskim kiselinama, aminokiselinama, proteinima, mineralima, eteričnim uljima (uglavnom d-limonenom), lipidima i ponajviše polifenolnim spojevima i vitaminima. Bitno je naglasiti da fizikalni i kemijski sastav otpada varira u različitim sastavnicama citrusa poput soka, albeda, flaveda, pulpe i sjemenki. Otpad citrusa čini ~ 5-70 % citrusa, od čega je ~ 60-65 % kora, ~30-35 % unutarnje tkivo, a do 10 % čine sjemenke [23].

Ekološki prihvatljivo rješenje je korištenje otpada citrusa u svrhu dobivanja vrijednih bioaktivnih spojeva kao što su fenolni spojevi, pigmenti, limonen, lipidi ili kao prekursor za sintezu CQDs, što je slučaj u ovom diplomskom radu.

Polifenolni spojevi su prirodno prisutni na vanjskoj površini citrusa, tj. u kori, a njihova svrha je zaštita unutarnjeg ploda od štetnih UV i IR Sunčevih zraka te od mikroorganizama. Najveću skupinu polifenolnih spojeva čine flavonoidi, prirodni heterociklički spojevi s kisikom, koji čine čak 10 % suhe mase citrusa. Najzastupljeniji flavonoidi u citrusima su; hesperidin, narirutin, naringin i eriocitrin. Hesperidin i narirutin prisutni su u čvrstim dijelovima citrusa, tj. u flavedo dijelu kore i sjemenkama, dok su naringin i eriocitrin prisutni u soku citrusa. Smatra se da je hesperidin odgovoran za obojenost citrusa budući da je njegova koncentracija veća u kori nego u soku i sjemenkama [23].

3. METODE KARAKTERIZACIJE CQDs

Karakterizacija je bitan dio istraživanja, koji osigurava provjeru sintetiziranih čestica, njihove veličine, svojstava i struktura.

3.1. Optička karakterizacija CQDs

Optička svojstva CQDs su najčešće okarakterizirana korištenjem UV-Vis spektroskopije i fluorescentne spektroskopije.

Za CQDs je karakteristično da UV-Vis spektar pokazuje glavni apsorpcijski pik u ultraljubičastom (UV) području i proteže se do vidljivog (Vis) područja. Većina istraživanja o CQDs pokazuje da postoje dva glavna apsorpcijska pika, jedan u području valnih duljina 230 – 280 nm, koji odgovara UV području i drugi u valnom području 300 – 330 nm, što zalazi i u Vis područje. Prvi apsorpcijski pik (230 – 280 nm) posljedica je π-π* prijelaza (HOMO-LUMO) C=C veze, što upućuje na pojavnost sp^2 hibridiziranih domena. Drugi apsorpcijski pik (300 – 330 nm) posljedica je n-π* prijelaza C=O veza, odnosno pobuđivanjem nesparenih elektrona kisika (n elektrona) iz C=O veze dolazi do prijelaza iz nevezne u protuveznu π* orbitalu. U nekim istraživanjima prijavljeno je postojanje pika pri valnoj udaljenosti od oko 300 nm, što odgovara n-π*/π-π* prijelazu COO^-/C-O-C veze [3,25].

Yao i sur. (2017) sintetizirali su CQDs koristeći otpadne ljuske oklopa rakova kao prekursor i uspjeli su dobiti UV-Vis spektar s blagim vrhom pri 350 nm, što odgovara vezanju pobuđene energije funkcijskih skupina na površini. Stoga se može reći da konačni UV-Vis ovisi o korištenim prekursorima, metodama sinteze i o načinu na koji se funkcionalizira površina materijala [26].

Zasigurno se može reći da je fluorescencija jedna od najzanimljivijih karakteristika CQDs, zahvaljujući kojoj imaju širok spektar primjene, od biomedicinske i farmaceutske analize pa do općenite nanotehnološke upotrebe. Fluorescencija je pojava kod koje tvar izložena elektromagnetskom zračenju emitira elektromagnetsko zračenje manje valne duljine od onog kojem je izložena, odnosno foton upadnog zračenja pobuđuje elektron, koji prelazi iz osnovnog u pobuđeno stanje. Posebna značajka fluorescencije je to što valna duljina i intenzitet emisije ovise o valnoj duljini pobude. Valna duljina emisije u većini je slučajeva veća od pridružene valne duljine apsorpcije, što nam govori da je energija emisije manja od energije apsorpcije. Postoji nekoliko potencijalnih teorija u vezi svojstava same emisije, a uključuju čimbenike kao što su; utjecaj veličine čestica, nepravilnosti na površini, brzina oksidacije, dopiranje s heteroatomima te dodavanje funkcijskih skupina na površinu čestica [25].

Fluorescentna spektroskopija je analitička tehnika koja se koristi da bi se utvrdile ili kvantitativno odredile tvari na temelju pojave ili mjerenjem intenziteta njihove fluorescencije, korištenjem spektrofluorometra. Mjerenje se izvodi na način da se suspenzija čestice koja se želi ispitati izloži elektromagnetskom zračenju UV dijelu spektra, a kao rezultat mjeri se nastala fluorescencija, pod kutom od 90° na upadno zračenje, fotoelektrički [27].

Xu i sur. (2017) su pripremili CQDs koristeći biomasu kao prekursor, točnije morsku algu *Enteromorpha prolifera* te su im ispitali optička svojstva. Utvrdili su da fotoluminescenti spektri ukazuju na ponašanje CQD koje je ovisno o ekscitaciji s maksimalnom emisijom pri 450 nm (područje plave svjetlosti) prilikom pobude na 370 nm [25,28].

Fotostabilnost ugljikovih kvantnih točaka, pri izlaganju različitim uvjetima korištenja, jedan je od ključnih faktora koji utječu na njihov širok spektar primjene. Objavljeno je dosta znanstvenih i literaturnih radova koji su istraživali ponašanje fotostabilnosti CQDs, tako je uočeno da su CQDs visoko fotostabilne nakon izlaganja;

- UV zračenju valne duljine 365 nm u vremenskom periodu od 2 sata [29]

- zračenju ksenonske lampe, snage 150 W u vremenskom periodu 2-3 sata [30]

- zračenju ksenonske lampe, snage 500 W u vremenskom periodu od 7 sati [31]

- sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 72 sata [30].

Također je u radu Chatzimitakos i sur. (2017) potvrđeno da nije došlo do promjene u intenzitetu emisije liofiliziranih uzoraka CQDs, skladišteni više od 6 mjeseci pri sobnoj temperaturi [30].

S druge strane CQDs dopirane dušikom i sumporom, pokazale su smanjenje intenziteta fotoluminescencije manje od 10 % nakon što su bile izložene UV zračenju (360 nm) u trajanju od 6 sati [32].

Fotostabilnost CQDs ovisna je o pH vrijednosti njihove suspenzije, stoga sami uvjeti CQDs variraju kao funkcija pH vrijednosti suspenzije, zbog prisutnosti različitih funkcijskih skupina; karboksilne, hidroksilne, amino. U istraživanju Tadesse i sur. (2020) utvrđeno je povećavanje intenziteta fotoluminescencije, N-dopiranih CQDs, smanjenjem pH vrijednosti sa 6 na 2, dok je povećanje pH vrijednosti sa 8 na 12 izazvalo smanjenje intenziteta fotoluminescencije [25,33].

3.2 Fizikalno-kemijska karakterizacija CQDs

3.2.1. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

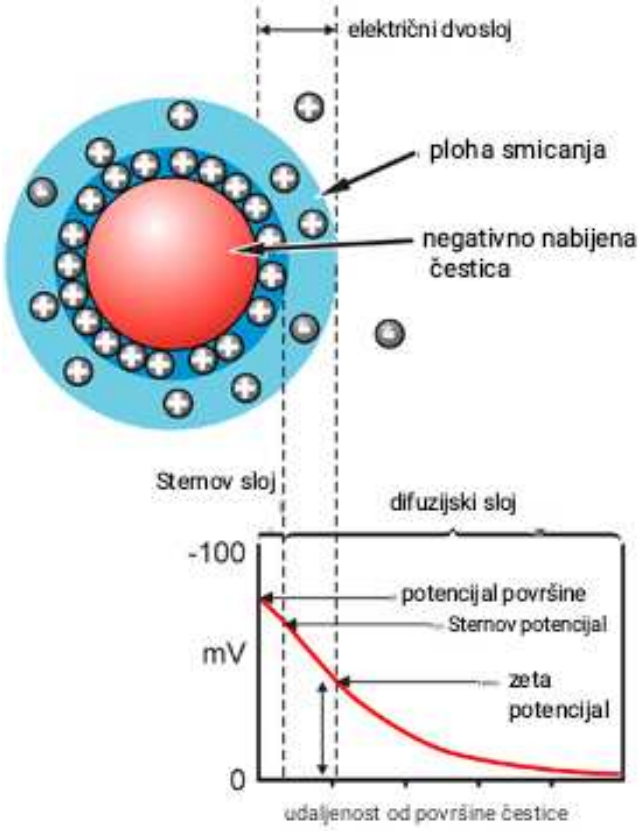
Transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *transmission electron microscopy* - TEM) tehnika koja se koristi za promatranje uzoraka koji su propusni za elektrone, na način da se snop elektrona propusti kroz uzorak, a propušteni elektroni se povećanjem i fokusiranjem pomoću elektronskih leća, koriste za formiranje slike. Bitno je da se uzorak pripremi kao vrlo tanka folija, kako bi elektroni mogli prodrijeti kroz površinu uzorka ili da se koristi dovoljno razrijeđeni uzorak. Transmisijski elektronski mikroskop je građom sličan optičkom mikroskopu, ali bitna razlika je u tome što TEM radi pri uvjetima visokog vakuuma. TEM ima 3 bitne sastavnice; (1) elektronski top – izvor snopa elektrona i kondenzatorski sustav koji fokusira snop elektrona na uzorak, (2) sustav koji stvara sliku – sadrži leću objektiva, držač uzorka, međuleću i projektorsku leću, koji fokusiraju elektrone koji se propuštaju kroz uzorak kako bi nastala realna i uvećana slika te (3) sustav za snimanje slike, koji pretvara sliku elektrona u oblik koji je vidljiv ljudskome oku. Propuštanjem elektrona kroz uzorak, oni se prilikom susreta s atomima difraktiraju proporcionalno debljini i gustoći područja na koje dolaze. Zaostali, nedifraktirani elektroni tvore elektronsku sliku uzorka, koja se zatim uvećava pomoću sustava elektronskih leća. Naposlijetku nastaje realna i uvećana slika na fluorescentnom zaslonu, gdje tamni dijelovi odgovaraju debljim i gušćim područjima uzorka. Kontrast slike može biti ogibni ili fazni. Ako je kontrast ogibni, prisutne su slike svijetlog i tamnog polja, koje posjeduju obrnuti kontrast te su povezane s ogibnom slikom istog područja koje se promatra na mikrografiji. Pomoću ogibne slike utvrđuje se simetrija promatranog uzorka. Stoga se na temelju ogibne slike može odrediti kristalna struktura uzorka [34,35].

3.2.2. Zeta potencijal

Određivanje zeta potencijala značajna je tehnika karakterizacije nanokristala za procjenu površinskog naboja te se može koristiti za razumijevanje fizikalne stabilnosti nanosuspenzija [36,37].

Na **Slici 3.** prikazana je negativno nabijena čestica, koja se nalazi u ionskoj otopini te je okružena električnim dvoslojem. Električni dvosloj se sastoji od unutarnjeg – Sternovog sloja iona, koji je zbog suprotnog pozitivnog naboja čvrsto vezan za površinu čestice i od vanjskog – difuzijskog sloja gdje su ioni nešto slabije povezani s površinom čestice. Unutar difuzijskog sloja postoji granica – ploha smicanja na kojoj su ioni i čestica stvorili uravnotežen oblik. Kako

se čestica giba uslijed Brownove difuzije ili primijenjene sile, stvara se razlika između iona koji se nalaze unutar granice te se gibaju zajedno s česticom i između iona koji su van granice i koji uglavnom ostaju dispergirani. Elektrokinetički potencijal na ovoj granici (plohe smicanja) je zeta potencijal [38,39].



Slika 3. *Shematski prikaz zeta potencijala* [39].

Nanočestice i koloidne čestice posjeduju površinski naboj u suspenziji te uslijed primjene električnog polja dolazi do interakcije između električnog polja i nabijene čestice, što rezultira gibanjem čestice. Brzina i smjer gibanja čestice su funkcija električnog polja, naboja i suspendirajućeg medija. Visoka pozitivna ili negativna vrijednost zeta potencijala nanokristala ukazuje na dobru fizikalnu stabilnost nanosuspenzija zbog elektrostatičkog odbijanja pojedinih čestica. Općenito se smatra da vrijednost zeta potencijala od -30 mV do +30 mV ima dovoljnu odbojnu silu za postizanje bolje fizikalne koloidne stabilnosti. Nasuprot tome niska vrijednost zeta potencijala može rezultirati agregacijom i flokulacijom čestica uslijed djelovanja privlačnih van der Waalsovih sila što može dovesti do fizikalne nestabilnosti. Čestice imaju tendenciju agregiranja u rasponu 0-5 mV. Minimalno stabilne čestice su u rasponu 5-20 mV, umjereno stabilne čestice u rasponu 20-40 mV, a visoko stabilne čestice u rasponu 40+ mV [36,37].

Drugi glavni čimbenik koji može utjecati na veličinu naboja na površini nanočestica je pH vrijednost suspenzije. Pri određenoj vrijednosti pH površinski naboj može iznositi nula, što je poznatije pod nazivom izoelektrična točka. Uz vrijednost zeta potencijala na fizikalnu stabilnost dobivenih nanosuspenzija utječu i sama svojstva materijala, prisutnost surfaktanata i kemija suspenzije [37,38].

3.2.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

DLS (engl. *Dynamic light scattering*) – dinamičko raspršenje svjetlosti je analitička tehnika koja se koristi za karakterizaciju nanočestica u disperziji. DLS je neinvazivna tehnika koja omogućuje praćenje veličine, distribucije, naboja i koncentracije nanočestica u suspenziji/otopini. Prednost korištenja DLS tehnike je brzo i pouzdano izvođenje mjerenja koje zahtjeva relativno malu količinu uzorka. DLS mjeri difuziju čestica koje se kreću pod utjecajem Brownovog gibanja. Veličina čestica, viskoznost suspenzije/otopine i temperatura utječu na promjenu brzine Brownovog gibanja. Tako na primjer manje čestice posjeduju veću brzinu Brownovog gibanja, povišenje temperature uzrokuje veću brzinu Brownovog gibanja, a vrijedi i obrat. Mjerenje se izvodi na način da izvor monokromatske svjetlosti (laser) usmjeri na uzorak, upadna svjetlost se raspršuje u svim smjerovima, a intenzitet raspršenja se bilježi detektorom [37].

3.2.4 Mikroskopija atomskih sila (AFM)

AFM (engl. *Atomic Force Microscopy*) – sustav za mikroskopiju atomskih sila koji pruža vizualizaciju i karakterizaciju površine i površinskih procesa uzorka na nanorazinama. Snima trodimenzionalnu topografsku sliku i omogućuje različite vrste mjerenja na površini uzorka (međumolekularne sile, sile adhezije, elastičnost uzorka, tvrdoća uzorka). AFM ima mogućnost kreiranja slike atomske razlučivosti s informacijama o visini razlučivosti na nanometrijskoj skali. To je nedestruktivna tehnika, koja ne zahtjeva prethodnu pripremu uzorka za analizu i moguće su analize uzoraka u tekućem stanju [40].

AFM koristi senzor mikroskopa s oštrim vrhom koji može skenirati površinu uzorka. Približavanjem površine uzorka vrhu senzora bilježi se mali otklon prema površini uzorka zbog privlačnih sila između površine uzorka i vrha senzora. No iako je vrh senzora mikroskopa približen površini uzorka na način da vrh senzora dolazi u dodir s površinom, odbojne sile su veće, a sam vrh senzora se odbija od površine uzorka. Samo udaljavanje ili približavanje vrha

senzora ka površini detektira se pomoću laserske zrake. Otklon vrha senzora uzrokuje blagu promjenu smjera reflektiranog snopa laserske zrake, što se prati pomoću fotoosjetljive diode. Stoga, kada AFM prijeđe preko izbočene površine, fotodioda bilježi otklon vrha senzora mikroskopa. Skeniranjem područja od interesa pomoću vrha senzora stvara se trodimenzionalna topografska slika površine uzorka [37,40].

3.2.5. Rendgenska difrakcija na prahu (PXRD)

PXRD (engl. *Powder X-ray Diffraction*) – rendgenska difrakcija na prahu je analitička tehnika kojom se određuje strukturna analiza i karakterizacija uzorka pomoću difrakcije rendgenskih zraka na kristalnoj rešetci. Interakcijom između snopa X-zraka i atomskih ravnina dolazi do djelomičnog prijenosa snopa, dok se ostatak apsorbira, lomi, raspršuje i difraktira od strane uzorka. X-zrake se od svakog elementa difraktiraju na drugačiji način, budući da su ovisne o atomskom rasporedu i vrsti atoma uzorka. X-zrake su eleketromagnetski valovi kratkih valnih duljina, između 0,001 – 10 nm. One nastaju „gađanjem“ metalne anode brzim električno nabijenim česticama u rendgenskoj cijevi. Na mjestu udara elektrona stvaraju se rendgenske zrake koje zrače u svim smjerovima. Nastale rendgenske zrake se kolimiraju (oblikuju se u paralelni snop) i usmjeravaju na fino usitnjeni prah uzorka koji se želi analizirati. Spektrograf rendgenskih zraka dobiva se promjenom kuta između izvora uzorka i detektora. Do raspršivanja dolazi kada rendgenska zraka prolazi kroz kristalnu rešetku. Svaki kristalni materijal posjeduje prepoznatljivu atomsku strukturu te na taj način difraktiraju rendgenske zrake u obliku jedinstvenom za svaki uzorak. Za mjerenje kuta difrakcije koristi se Braggova jednadžba;

$$2d \sin\theta = n \lambda \quad (1)$$

gdje je d - razmak između ravnina, θ – upadni kut, n – cijeli broj, λ – valna duljina [37].

3.2.6. Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija (FTIR)

Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy* – FTIR) je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju organskih i anorganskih materijala korištenjem infracrvene svijetlosti za skeniranje uzorka. FTIR se može koristiti prilikom identifikacije i karakterizacije nepoznatih materijala, za otkrivanje prisutnih nečistoća u materijalu te za utvrđivanje razgradnje i oksidacije uzorka. Analiza se izvodi na način da infracrveno zračenje iz izvora prolazi kroz interferometar i dolazi do detektora, nakon

toga signal se pojačava i pretvara u digitalni signal pomoću A/D pretvarača i pojačala, naposlijetku se signal prenosi na računalo gdje se provodi Fourierova transformacija. Infracrveno zračenje valnih duljina od oko 10 000 – 100 cm^{-1} se šalje kroz uzorak, pri čemu se dio zračenja apsorbira, a dio prolazi kroz uzorak. Uzorak pretvara ono zračenje koje se apsorbira u vibracijsku ili rotacijsku energiju. Na detektoru se dobiva završni signal, odnosno spektar valnih duljina najčešće od 4000 do 400 cm^{-1}, koji predstavlja molekularni otisak analiziranog uzorka. Svaka molekula posjeduje jedinstven molekularni otisak stoga je FTIR izvrstan alat za kemijsku identifikaciju [37].

3.2.7. Energetsko-disperzijska rendgenska spektroskopija (EDS)

Energetsko-disperzijska rendgenska spektroskopija (engl. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* – EDS) je analitička tehnika koja omogućuje kemijsku karakterizaciju materijala, a temelji se na principu „gađanja“ površine uzorka snopom elektrona, a kao posljedica dolazi do emisije X-zraka iz uzorka. Uzorak materijala pobuđen izvorom energije, poput elektronskog snopa elektronskog mikroskopa, raspršuje dio apsorbirane energije na način da snop elektrona daje dovoljno energije za skok elektrona iz unutarnje ljuske (bliže jezgri) u susjednu vanjsku ljusku. Kao posljedica u unutarnjoj ljusci zaostaje prazno mjesto, a kako bi se to prazno mjesto popunilo elektron se iz vanjske ljuske vraća u unutarnju ljusku, prilikom čega oslobađa razliku u energiji, odnosno emitira X-zraku. Svaka X-zraka ima karakterističan spektar ovisno o ljusci gdje je došlo do emisije kvanta energije i o atomu od kojeg je emitirana. To omogućuje analizu sastava danog uzorka koji je pobuđen izvorom energije. Položaj vrhova u spektru identificira kemijski element, dok intenzitet signala odgovara koncentraciji elementa. Stoga se dodavanjem EDS detektora elektronskom mikroskopu mogu dobiti informacije o sastavu analiziranog uzorka, sve do atomske razine. Dok elektronska sonda skenira uzorak, emitiraju se i mjere karakteristične X-zrake; svaki snimljeni EDS spektar se preslikava s određene pozicije na analiziranom uzorku. Kvaliteta rezultata ovisi o snazi signala i čistoći spektra. Jačina signala se uvelike oslanja na dobar omjer signala i šuma, posebno za otkrivanje elemenata u tragovima i minimiziranje doze što omogućuje brže snimanje i rezultate bez artefakata [41].

4. PRIMJENA I BIOLOŠKA AKTIVNOST CQDs

Kao što je već prethodno rečeno, CQDs posjeduju izvanredna fizikalna, kemijska i optička svojstva. Zahvaljujući svojoj maloj veličini, jakom intenzitetu fotoluminescencije, niskoj toksičnosti, dobroj biokompatibilnosti te mogućnosti jednostavne površinske modifikacije i funkcionalizacije, koja rezultira stvaranjem CQDs izvrsne stabilnosti i odlične topljivosti u različitim medijima, CQDs dobivene iz biomase su povoljan materijali za širok spektar primjene. Budući da CQDs posjeduju vrhunska fotoluminescencijska svojstva i različite funkcijske skupine na površini, pokazale su veliku sposobnost detekcije različitih analita, poput metala i organskih spojeva. Također zahvaljujući svim navedenim svojstvima CQDs se mogu koristiti; u *in vivo* snimanju i ciljanoj terapiji, kao senzori, u isporuci lijekova, fotokatalizi, prilikom skladištenja energije, kao LED diode i kao fluorescentna tinta [3,12]. Unatoč svemu navedenom ovo poglavlje će biti usmjereno na njihovu biološku primjenu i primjenu kao senzora za detekciju metalnih iona.

Zahvaljujući svojim izvrsnim optičkim svojstvima, CQDs su pronašle široku primjenu u području biomedicine. Budući da posjeduju nisku citotoksičnost i dobru biokompatibilnost, zadovoljavaju osnovne preduvjete za *in vivo* snimanje stanica i tkiva te su na taj način uspjele zamijeniti klasične poluvodičke kvantne točke koje su zbog svojih intenzivnih i podesivih fotoluminescentnih karakteristika dugi niz godina nalazile svoju primjenu u biomedicinskom polju, ali velik problem poluvodičkih kvantnih točaka bila je njihova toksičnost i upotreba teških metala prilikom njihove sinteze stoga su klasične kvantne točke uspješno zamijenjene netoksičnim, ekološki i biološki prihvatljivim CQDs [18].

4.1. *Bioimaging*

U današnje vrijeme sve popularniji alat za objašnjenje bioloških mehanizama i otkrivanje dinamike i funkcija mnogih staničnih procesa postaje *bioimaging* živih stanica. *Bioimaging* je tehnika za direktnu vizualizaciju bioloških procesa pomoću koje se u stvarnom vremenu dobiva informacija o 3D strukturi promatranog uzorka, bez izravne fizičke interakcije. *Bioimaging* obuhvaća promatranje substaničnih struktura korištenjem izvora za oslikavanje; svjetlo, fluorescencija, elektroni, ultrazvuk, X-zrake, magnetska rezonancija, pozitroni. Bitno je naglasiti da uvjeti okoliša u kojima se nalazi uzorak moraju biti jednaki prirodnom staničnom okruženje, sve kako ne bi došlo do induciranja staničnog stresa. Također je bitno osigurati minimiziranje promjena pH budući da je optimalan pH za većinu stanica sisavaca između 7,2 i

7,4, uz to je potrebno održavati fiziološku temperaturu (37 °C) u svrhu spriječavanja odvajanja stanica ili nastanka promjena u morfologiji stanica tijekom dužeg izlaganja zračenju. Dva su najčešća problema s kojima se moguće susresti prilikom snimanja živih stanica: fototoksičnost i fotoizbjeljivanje. Fototoksičnost se očituje prilikom upotrebe visokoenergetskog svjetlosnog zračenja kao što je lasersko ili ultraljubičasto zračenje na način da dolazi do; promjena u strukturi membrane stanica, smrti stanica, vakuolizacije (stvaranje vakuola ili struktura sličnih vakuolama, unutar ili uz stanice). Prilikom interakcije svjetlosnog zračenja sa stanicama, dolazi do porasta temperature zbog pobuđivanja svjetlosno aktivnih molekula koje mogu potaknuti stvaranje slobodnih radikala i izazvati nastanak radikalskih lančanih reakcija, koje posljedično napadaju stanične membrane, lipide. itd.. Stoga kako bi se smanjio oksidativni stres i nagle promjene temperature potrebno je koristiti izvor zračenja minimalne energije i intenziteta svjetlosnog zračenja. Drugi problem koji se javlja prilikom *bioimaging*-a je fotoizbjeljivanje, odnosno gubitak fluorescentnih signala tijekom dužeg snimanja živih stanica. Čimbenici koji utječu na proces fotoizbjeljivanja su fotoosjetljivost fluorescentnih boja, razina ekspresije fluorescentnih proteina te veličina uzorka koji se snima. Tako je snimanje živih stanica malih fluorescentnih vezikula osjetljivije na fotoizbjeljivanje u usporedbi sa snimanjem slika većih fluorescentnih organela kao npr. jezgre [42].

Čimbenici koji utječu na *bioimaging* živih stanica su održivost stanica, učinkovitost i rezolucija konfokalnog mikroskopa s kojim se vrši snimanje te vrsta fluorescentne komponente koja se koristi. CQDs posjeduju fotoluminescentna svojstva, nisku citotoksičnost i visoku biokompatibilnost s biološkim sustavima, tri neophodna svojstva za jednostavno fluorescentno snimanje živih stanica i tkiva. CQDs mogu prilikom *bioimaging*-a biti lokalizirane u staničnoj membrani ili u citoplazmi, a za visoku rezoluciju slike važno je olakšano prodiranje CQDs kroz citoplazmu stanice. Bitno je napomenuti da se uvijek prije upotrebe CQDs kao fluorescentnog kontrastnog sredstva u *bioimaging*-u, provjerava njihova citotoksičnost pomoću MTT metode [42].

Ponašanje emisije CQDs ovisno o ekscitaciji omogućuje kontrolu i odabir valne duljine ekscitacije i emisije. CQDs sa ili bez površinske pasivizacije se mogu koristiti kao sredstvo za označavanje ako pokazuju visoko kvantno iskorištenje emisije fotoluminescencije. Točan mehanizam ulaska CQDs u stanicu je još potrebno detaljno razjasniti, međutim moguće je koristiti CQDs kao fluorescentne markere za ispitivanje različitih staničnih organela poput; lizosoma, endosoma, Golgijeva tijela, mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma [42].

Yang i sur. (2009) u svom radu navode kako su poluvodičke kvantne točke dugi niz godina korištene za *in vitro* i *in vivo* snimanje stanica, upravo zahvaljujući visokoj fotoluminescenciji, visokoj fotostabilnosti i otpornosti na metaboličku degradaciju. Međutim njihov glavni problem je to što sadrže kadmij ili druge teške metale koji su toksični čak i pri jako niskim koncentracijama. Otkriće netoksičnih ugljikovih kvantnih točaka koje se mogu površinski pasivizirati i uz to snažno fluorescirati u vidljivom i bliskom infracrvenom dijelu spektra bilo je od posebnog interesa. Također je utvrđeno da su novootkrivene CQDs fizikalno-kemijski i fotokemijski stabilne i netrepćuće [43].

Yang i sur. (2009) odlučili su sintetizirati CQDs laserskom ablacijom ugljične čađe uz tretiranje sa dušičnom kiselinom i pasiviziranje s PEG_{1500} kako bi ih usporedili s komercijalno dostupnim poluvodičkim CdSe/ZnS točkama. Korištenjem TEM mikroskopije i AFM-a su detektirane su CQDs veličine 4-5 nm, također je utvrđeno kvantno iskorištenje od oko 20 % pri valnoj duljini pobude od 440 nm. Izvršili su procjenu toksičnosti CQDs *in vivo* na CD-1 miševima. Miševi su bili podijeljeni u tri skupine po pet jedinki, dvije skupine su bile izložene dvjema različitim koncentracijama CQDs, a treća je skupina izložena 0,9 % vodenoj otopini NaCl-a, koja je uzeta kao netoksična kontrola. Miševi iz prve skupine bili su izloženi intravenskom unosu CQDs, injektiranjem 200 μg/mL, druga skupina je izložena unosu tri injekcije od 333 μg/mL (u razmaku od 4 sata između injekcija), a treća kontrolna skupina je izložena 0,9 % NaCl. Prvog, sedmog i dvadesetosmog dana nakon izlaganja CQDs, miševi su žrtvovani, a potrebni uzorci krvi i organa za toksikološko ispitivanje su prikupljeni. Kako bi se utvrdio utjecaj CQDs na miševe, odrađeni su biokemijski testovi krvnog seruma. Rezultati su pokazali kako su dva parametra jetre, alanin amino transferaza (ALT) i aspartat amino transferaza (AST), bili u sličnim rasponima koncentracija za miševe izložene različitim koncentracijama CQDs i za kontrolnu skupinu. Rezultati parametara bubrežnih funkcija; mokraćne kiseline (UA), dušik iz uree u krvi (BUN) i kreatinin (Cr) su također bili neznatno promijenjeni među trima skupinama miševa. Ovim istraživanjem Yang i sur. (2009) su dokazali kako dobiveni rezultati upućuju na odsustvo toksičnosti CQDs kod miševa pri koncentracijama većim od onih koje se obično koriste u optičkom snimanju i za relativno dugo vrijeme izloženosti (do 28 dana). Također su napravljene usporedbe između organa miševa izloženih većoj koncentraciji CQDs i onih izloženih 0,9 % vodenoj otopini NaCl-a. Histopatološkom analizom jetre, slezene i bubrega utvrđene su normalne strukture organa, nakon 1., 7. i 28. dana izloženosti CQDs, u odnosu na kontrolnu skupinu. Nežrtvovani miševi su preživjeli tijekom četiri tjedna istraživanja, njihov unos hrane i vode je bio redovit, niti jedan nije pokazivao

znakove anoreksije, niti neke druge kliničke simptome poput gubitka dlake, malformacija kože, povraćanja ili proljeva. Također je i njihova aktivnost bila normalna bez nasilnog ili letargičnog ponašanja [43].

4.1.1. Antitumorska primjena

Prema kliničkim svojstvima, tumore je moguće podijeliti na benigne (dobroćudne) i maligne (zloćudne). Rak je uvriježena riječ za maligne tumore i može se reći da je pošast suvremenog doba. Maligni tumori su skupina bolesti koja uključuje abnormalni rast stanica s potencijalnom mogućnosti invazije ili širenja na druge dijelove tijela. Maligni tumori podjednako pogađaju i mušku i žensku populaciju, a posljednjih se desetljeća povećava broj obolijevanja među mlađom populacijom [44]. Postoji nekoliko mogućnosti liječenja raka, a najčešći su: operativno odstranjivanje, kemoterapija, terapija zračenjem i ciljana terapija. Nedostatci navedenih metoda su: nemogućnost ubijanja mikroskopski tvorevina, oštećenja susjednih normalnih tkiva, toksičnost, nuspojave, stvaranje otpornosti. Stoga se zbog navedenih nedostataka, sve veća pozornost usmjerava na razvoj novih lijekova i medicinskih materijala. Zahvaljujući svojim jedinstvenim fizikalno-kemijskim svojstvima i sposobnosti ulaska kroz citoplazmu stanice, CQDs posjeduju veliki potencijal za biomedicinske primjene [45].

Xia i sur. (2019) koristili su CQDs pripravljene iz zrna crvenog graha, kako bi uvidjeli mogu li CQDs inhibirati proliferaciju i migraciju nekoliko staničnih linija tumora te mogu li pospješiti inhibicijski učinak standardnog lijeka za kemoterapiju, kada se koristi u kombinaciji s CQDs. Koristili su stanične linije raka jetre (HepG2, HepG2.2.15, PLC/PRF/5, Huh-7, Huh-1, HLE, HLF, SK-Hep-1, Hep3B i BEL-7402), stanične linije raka gušterače (Panc-1, CAPAN-1, MIA-Paca-2 i SUIT-2), staničnu liniju intrahepatičnog kolangiokarcinoma (RBE – rak žučnih kanala) i staničnu liniju kolorektalnog adenokarcinoma (DLD-1 – rak debelog crijeva). Pripremili su različita razrijeđenja CQDs za tretiranje staničnih linija tumora, koncentracija: 5 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,05 mg/mL. Koristili su MTT test kako bi procijenili u kolikoj su mjeri CQDs inhibirale proliferaciju navedenih tumorskih staničnih linija. Tretirali su tumorske stanice različitim koncentracijama CQDs (5, 0,5 i 0,05 mg/mL) i mjerili proliferaciju stanica nakon 24, 48 i 72 sata. Rezultati su pokazali kako je inhibicijski učinak CQDs ovisan o dozi i proteklom vremenu i da CQDs najviše i najizraženije inhibiraju staničnu proliferaciju pri masenoj koncentraciji od 5 mg/mL. Nadalje su ispitali učinak CQDs na migracijsku sposobnost tumorskih stanica. Koristili su šest staničnih linija raka jetre (HLF, SK-Hep-1, Huh-7, HLE, HepG2, Hep3B) i tretirali ih sa CQDs, γ = 0,5 mg/mL. Nakon 72 sata usporedili su stanične

linije raka jetre tretirane CQDs sa kontrolnom skupinom (stanične linije raka jetre netretirane s CQDs) i uvidjeli kako su CQDs uspješno smanjile migraciju stanica raka jetre. Naposlijetku su istražili u kolikoj mjeri kombinacija CQDs i doksorubicina (kemoterapijskog lijeka) inhibira proliferaciju tumorskih stanica. Ponovno su koristili šest staničnih linija raka jetre (HLF, SK-Hep-1, Huh-7, HLE, HepG2 i Hep3B) i uspostavili četiri eksperimentalne skupine. Prvu skupinu su činile stanice raka jetre tretirane s CQDs, γ = 0,5 mg/mL, druga skupina: stanice raka jetre tretirane doksorubicinom, c = 800 nM, treća skupina – skupina kombinirane terapije, stanice raka jetre tretirane s 0,5 mg/mL CQDs + 800 nM doksorubicina, dok je četvrta skupina bila kontrolna skupina – samo stanice raka jetre. Rezultati su pokazali kako je inhibicija proliferacije bila najizraženija i najveća u trećoj skupini, odnosno u skupini kombinirane terapije. Stoga dobiveni rezultati ukazuju na to da bi kombinirana primjena mogla povećati terapijsku učinkovitost konvencionalno dostupnih kemoterapijskih lijekova [45].

4.1.2. Antibakterijska primjena

U današnje vrijeme sve veći problem postaju bakterije koje su sve otpornije na antibiotike stoga se veliki izazovi stavljaju pred suvremenu medicinu i učinkoviti pronalazak rješenja u smanjenju širenja patogenih mikroorganizama i liječenju zaraznih bolesti. Istraživanja koja se fokusiraju na liječenje zaraznih bolesti otkrila su kako veliki potencijal leži u primjeni nanomaterijala kao antibakterijskih sredstava. Tako su se među nizom istraženih nanomaterijala, našle i veliku pozornost privukle i CQDs, zahvaljujući svojoj izvrsnoj biokompatibilnosti i fotoluminescentnim svojstvima. Autori Chai i sur. (2021) pripremili su CQDs dopirane fosforom, hidrotermalnom sintezom *m*-aminofenola i fosforne kiseline, s kvantnim iskorištenjem od oko 14,4 %. Dobivenim P-dopiranim CQDs određen je maksimum valne duljine emisije na 501 nm, pri valnoj duljini ekscitacije na 429 nm. Sintetiziranim P-dopiranim CQDs provjerena je citotoksičnost *in vitro* analizom i otkrivena je dobra biokompatibilnost. Bakterije *Escherichie coli* (*E. coli* – gram negativna bakterija) i *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* – gram pozitivna bakterija) su inkubirane 4 sata s prethodno pripremljenim P-dopiranim CQDs, a bakterije bez dodanih CQDs su korištene kao kontrolna skupina. P-dopirane CQDs su pokazale učinkovito antibakterijsko djelovanje protiv *E. coli* i *S. aureus*, a minimalne inhibitorne koncentracije P-dopiranih CQDs su iznosile 1,23 mg/mL za *E. coli* i 1,44 mg/mL za *S. aureus*. Nadalje, kako bi se istražilo ponašanje bakterija prije i nakon tretiranja s P-dopiranim CQDs, morfologija bakterija je promatrana SEM mikroskopijom. Ponovno su *E. coli* i *S. aureus* inkubirane s P-dopiranim CQDs (1,23 mg/mL i 1,44 mg/mL)

tijekom 4 sata. Morfologija *E. coli* i *S. aureus* bez dodatka P-dopiranih CQDs je ostala netaknuta i nepromijenjena, dok su stanične stijenke bakterija inkubiranih s P-dopiranim CQDs postale deformirane, naborane i oštećene, a čak se i nešto citoplazme izlučilo iz stanica. I naposlijetku odradili su i analizu zeta potencijala, koja je pokazala kako su P-dopirane CQDs pozitivno nabijene (+23,1 mV), dok su bakterije negativno; *E. coli* (-11,6 mV), a *S. aureus* (-16,0 mV). Nakon što su bakterije tretirane s P-dopiranim CQDs ponovno im je izmjeren zeta potencijal te je bio malo pozitivniji; za *E. coli* (-7,7 mV), a za *S. aureus* (-8,8 mV). Što je dovelo do zaključka da su se pozitivno nabijene P-dopirane CQDs povezale s bakterijama elektrostatskim interakcijama, što je na kraju dovelo do nastanka defekata na površini bakterija, odnosno staničnih stijenki i na kraju do smrti bakterija [46].

4.2. Antioksidacijska aktivnost i njezina važnost u prehrambenoj industriji i biomedicini

Antioksidansima se nazivaju skupine spojeva koje neutraliziraju slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve, ROS-ove (engl. *reactive oxygen species*) u stanicama. Oni pružaju zaštitu organizmu od štetnog djelovanja uzrokovanog slobodnim radikalima te na taj način smanjuju rizik od razvoja mnogih kroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, anemiju, upale, rak, bolesti srca, ali i sam proces starenja. Antioksidanse je moguće podijeliti u dvije osnovne skupine: prirodni i sintetski. Također ih je moguće klasificirati prema izvorima: endogeni i egzogeni, prema svojim učincima: enzimski i neenzimatski, prema topljivosti: topljivi u vodi ili topljivi u lipidima. Prirodni antioksidansi su tvari prisutne u hrani i sprječavaju reakcije u hrani, poput poremećaja kiselosti i promjene boje. Prisutni su i u mikroorganizmima, u nekim životinjskim tkivima i u skoro svim biljkama. Prirodni antioksidansi imaju visoko antioksidativno djelovanje, posebice crveno, narančasto i ljubičasto voće i povrće. U najvažnije skupine antioksidansa ubrajaju se tokoferoli, tokotrienoli, askorbinska kiselina, flavonoidi. Karotenoidi su skupina žutih, narančastih i crvenih pigmenata koji se nalaze u većini voća i povrća, oni su neenzimski prirodni antioksidansi i njihova se antioksidacijska aktivnost temelji na svojstvima gašenja singletnog kisika i sposobnosti hvatanja peroksilnih radikala. Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti biljaka, a najvažniji su flavonoidi, fenolne kiseline i stilbeni. Budući da fenolni spojevi u svom sastavu sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina (-OH), izravno vezanih na C atom benzenskog prstena, smatraju se snažnim antioksidansima budući da mogu ukloniti gotovo sve molekule oksidansa, poput

slobodnih radikala, pomoću -OH skupina. Flavonoidi posjeduju visok redoks potencijal, koji im omogućuje da djeluju kao redukcijski agensi, donori vodika i gasitelji singletnog kisika [47].

Prirodni i sintetski antioksidansi su vrlo važni za prehrambenu industriju. Niska kvaliteta hrane nastaje kao posljedica lančanih autooksidacijskih reakcija u hrani, koje uzrokuju nastanak lošeg izgleda, okusa, mirisa i teksture hrane. Kako bi se smanjila ili potpuno spriječila oksidacija lipida u prehrambenim proizvodima, posljednjih se 50-ak godina, prilikom tehnološke proizvodnje prehrambeni proizvoda, dodaju aditivi. Najčešće korišteni aditivi uključuju prirodne antioksidanse; askorbinska kiselina i tokoferoli ili sintetske antioksidanse; propil galat (PG), tercijarni butilhidrokinon (TBHQ), butilirani hidroksitoluen (BHT), butilirani hidroksianizol (BHA). Posljednjih godina utvrđeno je da sintetski antioksidansi mogu pokazivati toksične učinke, skuplji su od prirodnih i pokazuju manju učinkovitost u odnosu na prirodne antioksidanse. Zbog navedenih razloga porastao je interes za konzumaciju prirodnih antioksidansa, ponajviše u razvijenim državama. Antioksidansi se smatraju aditivima koji ne mogu narušiti ili ugroziti zdravlje ljudi, već naprotiv mogu pridonijeti zdravlju organizma [47].

U današnje vrijeme je vrlo bitan razvoj novih biokompatibilnih antioksidativnih materijala koji imaju potencijalne primjene u borbi protiv upalnih procesa, raka, pa čak i starenja, koje uzrokuju oksidativni stres i reaktivne kisikove vrste. Rodriguez-Varillas i sur. (2022) koristili su rajčicu kako bi dobili biokompatibilne antioksidativne CQDs. Očekivali su da će CQDs sintetizirane iz soka rajčice pokazivati veoma visoku antioksidacijsku sposobnost, budući da je rajčica odličan izvor antioksidansa; karotenoida (α-karoten, β-karoten, likopen i lutein) i fenolnih spojeva (fenolne kiseline, flavonoidi i tanini). CQDs su pripravljene hidrotermalnom sintezom pri 160 °C kroz 3 h, zatim su centrifugirane, neutralizirane, profiltrirane i pročišćene dijalizom u Milli-Q vodi, korištenjem vrećica za dijalizu (MWCO: 1kDa), tijekom 20 h. A kao usporedba za antioksidativne nanočestice odabrali su CQDs na bazi glutationa (G-CQDs). HR-TEM mikroskopijom su detektirane sferične nanočestice, dobivene sintezom iz soka rajčice, veličine 9 ± 3 nm, dok su CQDs na bazi glutationa (G-CQD) bile puno manje, promjera 3,0 ± 0,6 nm [48].

Antioksidacijsku aktivnost je procijenjena DPPH metodom, odnosno kolorimetrijskom metodom koja se temelji na promjeni boje iz ljubičaste u žutu. Do promjene boje dolazi uslijed redukcije DPPH, odnosno oksidirani oblik DPPH (ljubičasto) hvata proton iz antioksidansa i prelazi u reducirani oblik DPPH2 (žuto). Žuća boja konačne suspenzije upućuje na veći broj prisutnih antioksidansa. Koristili su različite rastuće koncentracije CQDs (od 4 do 20 ppm) i pomiješali ih sa 250 µg/mL otopine DPPH, nakon skladištenja 30 minuta u mraku, izmjerili su

apsorbanciju na 517 nm. Uspoređen je antioksidacijski učinak između CQDs dobivenih iz rajčice i G-CQDs, usporedbom rezultata inhibicije DPPH. Kao što je prethodno spomenuto određivanje se temelji na djelovanju slobodnog radikala DPPH· na antioksidans, antioksidans predaje atom vodika, odnosno atom vodika iz površinskih funkcionalnih skupina (-OH, -COOH) ugljikove kvantne točke biva vezan na DPPH·/ROS (gdje je ROS: $O_2^{\cdot -}$, HO·, H_2O_2, $^1O_2$). To uzrokuje nastanak odgovarajućeg radikala (ovisno o ROS-u) na površini CQD, a radikal ima dva moguća puta stabilizacije: delokalizacija nesparenog elektrona rezonancijom u aromatskom okruženju jezgre CQD ili pregradnjom kemijskih veza samih površinskih funkcionalnih skupina. Rezultati su pokazali kako su CQDs dobivene iz rajčice pokazivale inhibiciju čak i pri najnižoj koncentraciji, dok je G-CQDs bilo potrebna bar četiri puta viša koncentracija da bi se postigla ista antioksidativna snaga. Nadalje EC_{50} (potrebna koncentracija antioksidansa za postizanje 50 % inhibicije DPPH) iznosila je ispod 4 ppm za CQDs dobivene iz rajčice, dok je za G-CQDs iznosila više od 14 ppm. Izvrsne rezultate CQDs dobivenih iz rajčice pripisali su prisutnosti velikog broja antioksidansa u soku od rajčice, a poznato je da prisutnost više antioksidansa u uzorku može pokazati sinergizam što je rezultiralo jačom antioksidativnom aktivnošću u usporedbi s G-CQDs. Uz to su utvrdili kako je jače antioksidacijsko djelovanje CQDs dobivenih iz soka rajčice, povezano s njihovom većom veličinom čestica, budući da veće čestice potencijalno imaju veći broj površinskih antioksidativnih funkcionalnosti, koje stoga mogu više komunicirati s okolišem [48].

4.3. Selektivnost i detekcija metalnih iona

Opće je poznato kako su poželjne karakteristike prilikom razvoja novih analitičkih metoda i senzora visoka osjetljivost, velika preciznost, jeftina, brza i što jednostavnija izvedba. Standardne analitičke metode za detekciju kemijskih analita uključuju dugotrajnu pripremu uzorka za analizu, ogromne i skupe mjerne uređaje, a ponekad i posebne uvjete rada i sa uzorcima i sa uređajima. Stoga je razvoj novih, bržih, praktičnijih i jeftinijih analitičkih metoda uvijek dobrodošao. Razvoj novih detekcijskih tehnika uključuje elektrokemijske metode, fluorescentne metode, kemiluminescencijske metode, itd.. U nastavku ovog poglavlja fokus će biti usmjeren na fluorescencijske detektore i na njihove prednosti poput preciznosti, točnosti, jednostavnosti te veće selektivnosti i osjetljivosti za određeni analit. Prilikom razvoja novih fluorescentnih detektora bitno je obratiti pažnju na odabir odgovarajućeg fluorofora s dobrim detekcijskim karakteristikama. Na karakteristike utječu životni vijek fluorescencije, kvantno iskorištenje fluorescencije, maksimum emisije fluorescencije, oblik vrpce emisije, itd.. Uz sve navedeno bitan utjecaj ima tip CQDs i prisutnost funkcionalnih skupina na površini, koje bi mogle stupiti u interakciju s različitim analitima [18]. Fluorescentne CQDs su korištene kao senzori za detekciju raznih metalnih iona, kemijskih vrsta i bioloških molekula, sve na temelju njihovog stupnja osjetljivosti i selektivnosti. Analit koji se detektira stupa u interakciju s površinom CQDs. Mehanizam interakcije između analita i CQDs se može opisati fotoinduciranim prijenosom elektrona i naboja, rezonantnim prijenosom energije ili efektom unutarnjeg filtera koji uzrokuje varijacije u svojstvima fotoluminescencije. Funkcionalne skupine koje se nalaze na površini CQDs se koriste za detekciju iona: Fe^{3+}, As^{3+}, Cr^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Hg^{2+}, Sn^{2+}, Pb^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Na^{+}, Al^{3+}, Mn^{2+}, te bioloških spojeva poput: vitamina B12, glukoze, galaktoze, L-cisteina, itd. [25]. CQDs se najčešće koriste kao senzori za detekciju metalnih iona, a posebice za detekciju teških metala. Teški su metali u današnje vrijeme sveprisutni u okolišu i može ih se pronaći u vodi, tlu, zraku i hrani. Moguće ih je podijeliti u dvije skupine: esencijalne i neesencijalne. U esencijalne metale se ubrajaju željezo, bakar, cink, molibden, selen, mangan, krom i oni su neophodni za normalnu funkciju organizama, ali se neki od njih (cink, krom, bakar) klasificiraju kao esencijalni elementi u tragovima te se njihove koncentracije izražavaju prefiksom mikro, stoga se povećanje njihovih koncentracija može smatrati kao potencijalna opasnost za organizme. U neesencijalne metale se ubrajaju olovo, živa, kadmij i arsen i klasificira ih se kao izrazito toksične i mutagene elemente za ljude, životinje i biljke te predstavljaju ozbiljan problem svojim nakupljanjem i cirkuliranjem Zemljinom biosferom. Stoga je od velike važnosti praćenje, očitavanje i detekcija

različitih metalnih iona, sve u svrhu kako bi se zaštitilo ljudsko, ali i zdravlje čitave Zemljine biosfere [18].

4.3.1. Detekcija željezovih iona

Upotrebom CQDs kao fluorescentnih nanoprobi se najčešće prilikom detekcije metalnih iona detektiraju ioni željeza (Fe^{3+}). Kao što je već prethodno spomenuto željezo je esencijalni element i neophodan je za normalnu funkciju organizma. Sastavni je dio hemoglobina, mioglobina i brojnih enzima u organizmu, također ima ključnu ulogu u metabolizmu kisika. Međutim i njegov manjak i prekomjerno nakupljanje u organizmu može uzrokovati poremećaje homeostaze i pojavu bolesti poput anemije, otkazivanja organa, upala, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, pa čak i smrti. Stoga je razvoj učinkovitog senzorskog sustava za ciljanu i osjetljivu detekciju željezovih iona od velike važnosti za biomedicinsku primjenu. Jedan od glavnih razloga zašto je željezo interesantnije od ostalih metala je to što Fe^{3+} može „komunicirati“ sa površinom CQDs. Naime na površini CQDs se nalaze razne funkcionalne skupine poput: karboksilnih, hidroksilnih i amino, navedene skupine imaju snažan afinitet za vezanje određenih metalnih iona što rezultira pojavom prigušenja signala fluorescencije (engl. *quenching*) [3,18,25].

Cheng i sur. (2019) sintetizirali su CQDs dopirane dušikom i sumporom iz biootpada točnije iz vrbovih grana, poznatijih kao cica-mace. N/S-CQDs sintetizirane su procesom izgaranja u jednom koraku, a zbog prisutnosti uree i sumporne kiseline tijekom izgaranja, dobiveno kvantno iskorištenje iznosilo je 14,3 %. Dobivene N/S-CQDs korištene su kao fluorescentne nanoprobe za detekciju Fe^{3+} iona. Kako bi se procijenila selektivnost sintetiziranih N/S-CQDs na Fe^{3+} ione, određen je omjer intenziteta fluorescencije između suspenzija N/S-CQDs u odsutnosti i prisutnosti različitih metalnih iona pri valnoj duljini 370 nm. Rezultati su pokazali visoko selektivno prigušenje signala fluorescencije dodatkom Fe^{3+} iona, dok je utjecaj drugih metalnih iona (Fe^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, Cr^{2+}, Al^{3+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}) na fotoluminescencijska svojstva N/S-CQDs bio zanemariv. Linearni raspon koncentracija od c = 40 -700 mM, s granicom detekcije od 0,03 mM. Upravo zbog prisutnosti velikih količina funkcionalnih skupina s kisikom i sumporom na površini N/S-CQDs, površina N/S-CQDs ima veći afinitet za Fe^{3+} ione naspram drugih metalnih iona. Također površina N/S-CQDs stvara jače kelacijske ili koordinacijske interakcije s Fe^{3+} ionima [25,32].

Cheng i sur. navode moguće objašnjenje *quenching*-a. Smatraju kako mehanizam za prijenos elektrona može biti značajan za objašnjenje snažnog učinka prigušenja signala fluorescencije sustava N/S-CQDs-Fe^{3+}. U početku zbog potpunog prijenosa elektrona iz LUMO u HOMO stanje, poznatog kao radijativna rekombinacija elektron/šupljina, slobodne N/S-CQDs pokazuju jaka fotoluminescencijska svojstva. Nakon dodatka Fe^{3+} iona, elektroni koji se nalaze u LUMO stanju N/S-CQDs prelaze u polupopunjene d orbitale Fe^{3+} iona, to dodatno olakšava neradijativnu rekombinaciju elektron/šupljina i posljedično rezultira gašenjem fotoluminescencije. A kako bi dobili još bolji uvid u moguće mehanizme gašenja fotoluminescencije, istražili su prosječno vrijeme trajanja fotoluminescencije N/S-CQDs prije i nakon dodatka Fe^{3+} iona. Rezultati su pokazali da se prosječno vrijeme trajanja fotoluminescencije smanjilo s 5,94 ns na 4,76 ns. Stoga je dobiveni rezultat dokazao pojavu dinamičkog gašenja fotoluminescencije između N/S-CQDs i Fe^{3+} iona i potvrdio mehanizam prijenosa elektrona [32].

4.3.2. Detekcija živinih iona

Ioni žive se klasificiraju kao neesencijalani i izuzetno toksičani metalni ioni koji su opasani i za okoliš i za zdravlje ljudi. Toksičnost Hg^{2+} iona predstavlja opasnost čak i pri jako niskim koncentracijama, budući da imaju sposobnost bioakumulacije [18]. Živa se koristi u brojnim industrijskim granama, poput proizvodnje kemikalija, boja, pesticida, fungicida, a na taj se način spojevi žive mogu akumulirati do opasnih razina. Akutno trovanje živom može biti posljedica slučajnog ili namjernog gutanja topljivih živinih soli (npr. živin klorid), ubrzo se javljaju simptomi; teška upala probavnog trakta, praćena grčevima, mučninom, povraćanjem i krvavim proljevom. Polagano se apsorbirana živa akumulira u bubrezima i uzrokuje zatajenje bubrega i smrt. Kronično trovanje živom nastaje uslijed dugotrajnog izlaganja živinim parama, prašini, hlapljivim organskim spojevima žive ili apsorpcijom živinih soli putem kože. Posljedice kroničnog trovanja živom su najčešće: metalni okus u ustima, ispadanje zubi, upala sluznice usne šupljine, bol i trnjenje ruku i nogu, gubitak težine i apetita te mentalne promjene poput depresije. Trovanje organskim spojevima žive, poput metil žive, rezultira nastankom lezija središnjeg živčanog sustava. Takav oblik trovanja živom je poznatiji kao Minamata sindrom, zadesio je 1956. godine japanski ribarski grad Minamatu. Simptomi su uključivali progresivno slabljenje mišića, gubitak vida, oštećenje cerebralnih funkcija, paralizu, a kod težih slučajeva ludilo, komu i smrt. Otkriveno je da su se isti simptomi javili i kod kućnih mačaka i kod morskih ptica, a budući da su se one jednako kao i ribari hranile ribom, uzrok je potražen

u ribi. Analizom riba i školjkaša iz Minamata zaljeva, otkrivene su izuzetno visoke koncentracije metil žive. Izvor metil žive je bila obližnja petrokemijska tvornica, koja je otpadne vode obogaćene metil živom puštala u zaljev Minamata. Od posljedica Minamata sindroma preminulo je više od 1000 ljudi, a skoro 2500 je oboljelo [49].

Stoga kako se ne bi ponovila slična ekološka katastrofa bitno je praćenje koncentracija iona žive u okolišu. Budući da su živini ioni široko rasprostranjeni onečišćivači koji se oslobađaju u biosferu prirodnim i antropogenim utjecajem, postoji mogućnost njihove akumulacije u ljudskom tijelu putem hranidbenog lanca. Huang i sur. (2013) u svom radu navode kako su posljednjih nekoliko godina dizajnirane različite fluorescentne probe za detekciju iona žive, a njihov razvoj se temelji na biomaterijalima, nanočesticama ugljika, nanočesticama metala i poluvodičkih kvantnih točaka. Također, navode kako je razvoj novih fluorescentnih nanoprobi korak u razvoju moćnog alata s visokom osjetljivosti i selektivnosti i mogućnošću praćenja u stvarnom vremenu. Problemi koje navode prilikom sinteze novih fluorescentnih nanoprobi uključuju dugotrajne i skupe sinteze, ekstremne uvjete sinteze (visoka temperatura i visok tlak), korištenje toksičnih tvari, stoga je njihova daljnja primjena ograničena [31].

Huang i sur. razvili su jeftinu, laku i zelenu sintezu fluorescentnih N-dopiranih CQDs. Pripravili su N-CQDs jednostavnom hidrotermalnom sintezom soka od jagode, u jednom koraku. Dobivene N-CQDs su pokazivale maksimum emisije fluorescencije pri valnoj duljini od 427 nm, dok je kvantno iskorištenje iznosilo 6,3 %. Sintetizirane N-CQDs primijenjene su kao fluorescentna nanoproba za detekciju Hg^{2+} iona. Linearni raspon koncentracija za detekciju Hg^{2+} iona je određen u rasponu od 10 nM do 50 μM i granicom detekcije od 3 nM. Osim na Hg^{2+} ione ispitali su selektivnost i detekciju N-CQDs na još 15 metalnih iona (Ca^{2+}, Ag^{+}, Ni^{2+}, Cr^{3+}, Al^{3+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Fe^{3+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} i Cd^{2+}). Međutim, uočeno je da samo Hg^{2+} ima sposobnost prigušenja intenziteta fluorescencije, naspram ostalih metalnih iona koji su imali zanemarivo male ili nikakve učinke prigušenja. Zaključili su kako visoka selektivnost fluorescentne nanoprobe, tj. N-CQDs prilikom detekcije Hg^{2+} iona proizlazi iz jačeg afiniteta Hg^{2+} iona prema karboksilnim, hidroksilnim i amino skupinama na površini N-CQDs, u odnosu na druge metalne ione. Odnosno došlo je do stvaranja N-CQDs-Hg^{2+} kompleksa koji je olakšao prijenos naboja i smirio radijativnu rekombinaciju eksitona i rezultirao prigušenjem intenziteta fluorescencije. Također, kako bi dobili daljnji uvid u mehanizam prigušenja intenziteta fluorescencije N-CQDs pomoću Hg^{2+}, proveli su mjerenje životnog vijeka fluorescencije. Rezultati su pokazali kako je životni vijek fluorescencije N-CQDs prije dodatka Hg^{2+} iona 7,6 ns, a dodatkom Hg^{2+} iona opada na 4,8 ns,

što ukazuje na dinamično prigušivanje signala fluorescencije i samim time dodatno potvrđuje brzi proces prijenosa elektrona u N-CQDs-Hg^{2+} sustavu. Nadalje su ispitali utjecaj različitih pH vrijednosti na prigušenje signala fluorescencije N-CQDs prilikom dodatka 50 μM Hg^{2+}. Pri niskim vrijednostima pH, površinski vezane karboksilne i amino su protonirane, samim time efikasnost prigušenja signala fluorescencije je niska te dolazi do disocijacije kompleksa N-CQD-Hg^{2+}. Porast pH rezultira deprotonacijom karboksilnih i amino skupina, učvršćuje kovalentnu vezu između N-CQDs i Hg^{2+} iona i posljedično dolazi do značajnog smanjenja intenziteta fluorescencije N-CQDs. Međutim, dodatno povećanje pH vrijednosti također uzrokuje nisku efikasnost prigušenja signala fluorescencije, budući da Hg^{2+} ioni mogu biti kompleksirani s OH^- ionima umjesto s N-CQDs. Stoga se može zaključiti kako karboksilne i amino skupine na površini N-CQDs igraju bitnu ulogu prilikom selektivnosti i detekcije Hg^{2+} iona. To bi značilo da se uspjelo utvrditi kako Hg^{2+} može prigušiti signal fotoluminescencije N-CQDs i stoga se N-CQDs mogu potencijalno koristiti kao Hg^{2+} senzori kako u modelnim sustavima, tako i u realnim uzorcima vode [31].

4.3.3. Detekcija bakrovih iona

Bakar je, nakon željeza i cinka treći najzastupljeniji esencijalni element u ljudskom organizmu. Široko je rasprostranjen u Zemljinoj kori. U prirodi može postojati u dva oksidacijska stanja: Cu(I) i Cu(II), a njegova sposobnost primanja ili otpuštanja elektrona igra bitnu ulogu u procesima prijenosa energije u biološkim sustavima i u staničnom disanju. Bakar je kofaktor mnogim enzimima, poput enzima uključenih u metabolizam željeza, u sintezi neurotransmitera, u energetskom metabolizmu, itd.. Kraća izloženost visokim razinama Cu(II), može uzrokovati gastrointestinalne smetnje, a dok dulja izloženost može izazvati teška oštećenja jetre i bubrega. Također može uzrokovati Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest [50].

Manoj i sur. (2017) pripravili su CQDs kao fluorescentnu nanoprobu za detekciju Cu^{2+} iona, koristeći lignit kao prekursor. Prednost lignita je to što je on lako dostupna i jeftina sirovina, u odnosu na ostale vrste ugljena ili npr. grafit. Korištenjem metode kemijske oksidacije iz lignita i dušične kiseline, nakon ultrazvučne obrade i dijalize, dobivene su N-CQDs. Sintetizirane CQDs bile su prikladne za korištenje u bioimagingu i kao fluorescentne nanoprobe, budući da nije došlo do fotoizbjeljivanja, ni do gašenja fluorescencije čak ni nakon stalnog izlaganja UV svjetlosti u periodu od 24 sata i skladištenju od 2 godine. Ispitana je učinkovitost fluorescentnih N-CQDs kao nanoprobi za selektivnost i detekciju metalnih iona; Cu^{2+}, Mn^{2+}, Na^+, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} i Cr^{2+}. Rezultati su pokazali kako najveću selektivnost za prigušenje signala fluorescencije

ima Cu^{2+}. Smatra se da je to posljedica visokog termodinamičkog afiniteta Cu^{2+} iona prema NO^- skupinama koje se nalaze na površini N-CQDs. Kao što je već prethodno spomenuto za ione željeza i ione žive, također i ioni bakra prigušuju signal fluorescencije nanoprobi, odnosno N-CQDs, putem prijenosa elektrona ili energije. A kako bi još dodatno ispitali potencijal sintetiziranih fluorescentnih N-CQDs u detekciji Cu^{2+} iona, istražili su ovisnost prigušenja signala fluorescencije o promjeni pH vrijednosti. Rezultati su pokazali kako pri niskoj pH vrijednosti (pH = 4) uzorak pokazuje visoku osjetljivost i može detektirati nisku koncentraciju Cu^{2+} iona od 0,0089 nM. Stoga su Manoj i sur. (2017) potvrdili potencijal dobivenih N-CQDs kao fluorescentnih nanoprobi za detekciju Cu^{2+} iona u vodi, s granicom detekcije od samo 0,0089 nM [51].

5. MATERIJALI I METODE

5.1. Kemikalije i materijali

Za izradu ovog diplomskog rada, prikupljene su kore klementine s OPG-a Dalibora Ujevića iz Opuzena, Hrvatska. Prije procesa sušenja, kore klementine su nekoliko puta isprane destiliranom vodom.

Popis kemikalija i materijala koji su korištene prilikom izrade rada:

- Milli-Q voda (električna provodnost ≤ 0,054 μS/cm)
- aminokiseline: L-leucin (Kemika, Zagreb, Hrvatska), triptofan (Kemika, Zagreb, Hrvatska), L-arginin (Merck, Njemačka), L-alanin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i histidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- organska otapala: etanol, metanol, aceton, dimetil sulfoksid (Merck, Njemačka)
- anorganske soli: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (BDH Prolabo, UK), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Kemika, Hrvatska), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (VWR International, SAD), KCl (Gram Mol, Hrvatska), $HgCl_2$ (VWR International, SAD), $MgCl_3 \cdot 6H_2O$ (T.T.T., Hrvatska), $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (Brend Kraft, Njemačka), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) and NaCl (Gram Mol, Hrvatska)
- DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (Merck, Njemačka)
- membrane (vrećice) za dijalizu Spectra/Por 7 – MWCO 1 kDa (Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA, SAD)
- NaOH (Gram Mol, Hrvatska)
- HCl (Merck, Njemačka)

Svi reagensi i kemikalije bili su analitičke čistoće te su korišteni bez daljnjeg pročišćavanja.

5.2. Mjerni uređaji i tehnike karakterizacije

Popis uređaja korištenih prilikom izrade rada:

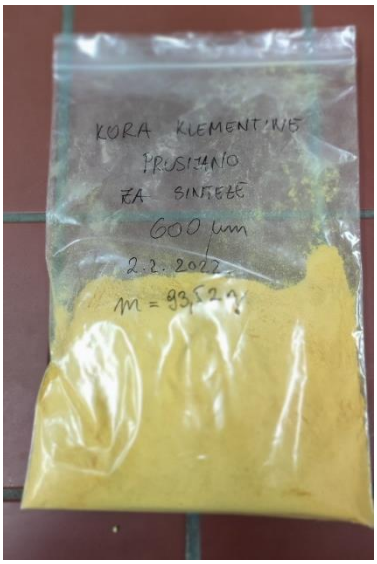
- Liofilizator (Christ, Alpha LSCplus, Njemačka)
- Univerzalni mlin (IKA M 20 univerzalni mlin, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 70 H, Elma, Siegen, Njemačka)
- Spektrofotometar Shimadzu FT-IR 8400S (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- UV-Vis apsorpcijski spektrofotometar uniSPEC 2 (LLG Labware, Češka Republika)

- Uređaj za difrakciju X-zrakama Empyrean (Malvern PANalytical, Almelo, Nizozemska)
- Skenirajući elektronski mikroskop (Hitachi S-4800, Japan)
- Transmisijski elektronski mikroskop visoke rezolucije (HR-TEM) – instrument FEI Tecnai G2 20 X Twin (FEI, Hillsboro, Oregon, SAD)
- Cary Eclipse fluorescencijski spektrofotometar (Varian Inc. Santa Clara, CA, SAD)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK)
- Vakuumski koncentrator (SpeedVac, Savant^{TM} SpeedVac^{TM}, Thermo Fisher Scientific, SAD)

5.3. Priprema nedopiranih i N-dopiranih CQDs

Kore klementine (prikupljene s obiteljske farme Ujević, Opuzen) su prvotno oprane vodovodnom vodom, zatim su tri puta isprane deioniziranom vodom i nakon toga su stavljene u komoru uređaja za ultra-duboko smrzavanje pri temperaturi od -80 °C u vremenskom trajanju od 24 sata. Nakon 24 sata prebačene su u liofilizator (Christ, Alpha LSCplus, Njemačka) gdje su izložene procesu liofilizacije, odnosno sušenju u smrznutom stanju. Proces liofilizacije je trajao 36 sati, tijekom sublimacije vode iz uzorka, temperatura unutar kondenzatora je bila oko -50 °C, a tlak oko 0,25 mbar. Smanjenjem udjela vode u uzorku, temperatura se postepeno povisila do 30 °C.

Nakon sušenja, oko 100 grama liofilizirane kore klementine je usitnjeno u mlinu (IKA M 20 univerzalni mlin) na 5000 RPM-a (engl. *revolutions per minute*) kroz 1 minutu i zatim prosijano na sito veličine pora 600 μm. Masa liofilizirane, usitnjene i prosijane kore klementine je iznosila 93,52 g kao što je prikazano na **Slici 4.**.



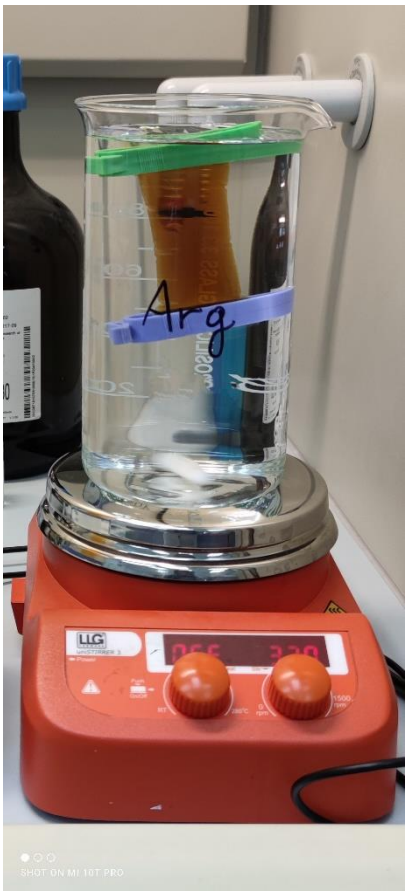
Slika 4. *Prikaz liofilizirane, usitnjene i prosijane kore klementine za sinteze* [autor].

Odvagano je 3 g usitnjene kore klementine i dispergirano u 90 ml Milli-Q vode (u omjeru 1:3), kao što je prikazano na **Slici 5.** i zatim stavljeno u ultrazvučnu kupelj (f = 37 Hz, p = 50 W) na 30 minuta. Dobivena smjesa je filtrirana, a 20 ml ekstrakta je prebačeno u autoklav od nehrđajućeg čelika obložen teflonom od 50 ml (Parr Instrument Company, Moline, IL, SAD). Autoklav je stavljen u sušionik da se zagrijava na 180 °C kroz 9 h. Prva hidrotermalna sinteza nedopiranih CQDs je označena kao blank sustav. Izvedeno je još 5 hidrotermalnih sinteza, kojima su sintetizirane N-dopirane CQDs. Priprema N-dopiranih CQDs je uključivala odvagu 175 mg aminokiselina, redom: leucin (Leu, M = 131,17 g/mol), triptofan (Trp, M = 204,23 g/mol), arginin (Arg, M = 174,20 g/mol), alanin (Ala, M = 89,09 g/mol) i histidin (His, M = 155,15 g/mol). 175 mg aminokiseline je otopljeno u 5 ml Milli-Q vode i zajedno s 15 ml ekstrakta kore klementine (1:3) prebačeno u autoklav obložen teflonom i zagrijavano na 180 °C tijekom 9 h i tako za svaku aminokiselinu posebno. Nakon završetka hidrotermalne sinteze, ohlađeni autoklav se otvara u digestoru, a njegov se sadržaj prebacuje u plastičnu falkonicu volumena 50 ml i centrifugira na 10000 RPM-a, 30 minuta. Nakon centrifugiranja, pripremljene CQDs se filtriraju pomoću filter šprice (pore 0,20 μm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) i pročišćavaju. Pročišćavanje uzoraka je provedeno korištenjem membrana za dijalizu Spectra/Por 7 (MWCO 1kDa), dobavljač Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA, SAD). Dijaliza je izvršena u 1 L Milli-Q vode tijekom 48 sati uz izmjenu vodu nakon 2 sata, što je utvrđeno kao dovoljno vrijeme dijalize za dobivanje pročišćenih fluorescentnih uzoraka. Prikaz dijalize vidljiv je na **Slici 6.**. Voda za dijalizu je mijenjana nakon 2 sata, a uzorak retentata se uzima nakon 48 sati dijalize. Po završetku dijalize pročišćene CQDs se prebacuju u plastičnu

falkonicu, falkonica se omotava aluminijskom folijom i pohranjuje u hladnjak na 4 °C. Pohranjene pročišćene CQDs se koncentriraju vakuumskim rotacijskim otparivačem (Savant™ SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific, SAD) za primjenu u daljnjim analizama.



Slika 5. *Usitnjena kora klementine dispergirana u Milli-Q vodi* [autor].



Slika 6. *Prikaz dijalize uzorka Arg@CQD* [autor].

5.4. Kvantno iskorištenje (QY)

Kvantno iskorištenje fluorescencije izmjereno je korištenjem kinin sulfata kao referentnog standarda, koji se dobije otapanjem u 0,1 M otopini H_2SO_4, 54 % pri valnoj duljini 360 nm. Zatim je izračunato prema jednadžbi:

$$\varphi_{CQD} = \varphi_{QS} \left[\frac{I_{CQD}}{A_{CQD}}\right]\left[\frac{A_{QS}}{I_{QS}}\right]\left[\frac{\eta^2_{CQD}}{\eta^2_{QS}}\right] \quad (2)$$

gdje je:

φ – kvantno iskorištenje

I – integrirani intenzitet fluorescencije pod spektrom emisije

A – apsorbancija pri valnoj duljini ekscitacije

η – indeks loma (za vodene otopine iznosi 1,33)

Oznaka „CQD“ odnosi se na uzorak pripremljenih ugljikovih kvantnih točaka, a „QS“ na referentni standard kinin sulfata. Kako bi se smanjio učinak reapsorpcije, vrijednosti optičke apsorpcije su održavane na <0,1.

5.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalna aktivnost CQDs i N-CQDs je određena DPPH metodom. Pripremljena je stock otopina; odvagano je između 5,80 mg i 5,90 mg DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i otopljeno u 50 ml metanola. Od stock otopine otpipetiran je alikvot volumena 16,660 ml i dopunjen s 83,340 ml metanola (ukupan volumen 100 mL). Sintetizirane CQDs su otparene na rotacijskom vakuum otparivaču, kako bi se koncentrirale do poznate koncentracije, γ = 2000 µg/ml. Kako bi se suspenzije CQDs razrijedile na 120 µg/mL, dodano je 1,2 mL CQDs uzorka masene koncentracije 2000 µg/mL + 18,8 mL Milli-Q vode (ukupno 20 ml). Pripremljen je niz razrijeđenih otopina CQDs, u rasponu koncentracija od 0 - 100 µg/mL (0,2 mL) i pomiješan s 50 µM svježe pripremljene otopine DPPH (1,0 mL). Tako pripremljeni uzorci su čuvani na mračnom mjestu 30 minuta prije mjerenja apsorbancije. Vrijednosti apsorbancije su izmjerene u tri paralele na 517 nm, koristeći UV-Vis spektrofotometar. Antioksidacijska aktivnost je uspoređena sa slijepom probom uzoraka te izračunata prema jednadžbi:

$$\%DPPH_{aktivnost} = \frac{(A_{DPPH} + A_B) - A_S}{A_{DPPH}} \cdot 100 \qquad (3)$$

gdje je:

A_{DPPH} – apsorbancija pripremljene otopine DPPH

A_{B} – apsorbancija uzorka

A_{S} – apsorbancija uzorka pomiješanog s pripremljenom otopinom DPPH

5.6. Određivanje selektivnosti i detekcije metalnih iona

Kako bi se procijenilo jesu li pripremljene CQDs učinkovite kao senzori za detekciju metalnih iona, ispitana je njihova selektivnost i sposobnost detekcije na ukupno devet metalnih iona: Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, K+, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Mn^{2+} i Na^{+}. Otapanjem odgovarajućih metalnih soli u Milli-Q vodi, pripremljene su osnovne otopine metalnih iona, koncentracije c = 100 μmol/ml. Sintetizirane CQDs su otparene na rotacijskom vakuum otparivaču, kako bi se koncentrirale do poznate koncentracije, γ = 2000 μg/ml. Nakon toga je otpipetirano 0,625 ml uzorka CQDs (γ = 2000 μg/ml) u praznu falkonicu od 50 ml i ostatak je napunjen Milli-Q vodom do vrha (49,375 ml), kako bi se dobile CQDs, koncentracije γ = 25 μg/ml, ukupno njih šest: nedopirane CQD, CQD@Leu, CQD@Trp, CQD@Arg, CQD@Ala, CQD@His. Naposlijetku su pripremljeni uzorci za mjerenje selektivnosti i detekcije metalnih iona. Prvo je otpipetirano 1 ml samih CQDs, bez dodatka metalnih iona, a ostali uzorci su pripremljeni dodavanjem 50 μL vodene otopine metalnih iona u 950 μL CQDs, kako bi ukupni volumen bio 1 mL. Mjerenja selektivnosti i detekcije metalnih iona su provedena pomoću fluorescentne spektroskopije pri valnoj duljini pobude λ_{EX} = 360 nm.

6. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu, kora klementine je korištena kao prekursor za dobivanje CQDs. Ukupno je izvedeno 6 sinteza i pripremljeno 6 različitih uzoraka CQDs u svrhu proučavanja razlika između njihovih optičkih, fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava. Prvi uzorak, nedopiranih CQDs (blank uzorak) pripremljen je korištenjem samo kore citrusa kao prekursora. Ostalih pet uzoraka, N-dopiranih CQDs, pripremljeno je koristeći koru klementine kao izvor ugljika i aminokiseline; Leu, Trp, Arg, Ala, His, kao N-dopante. Razlika između blank uzorka CQDs i N-dopiranih CQDs, prvotno je uočena u boji uzorka. Boja blank uzorka bila je blijedo žuta, dok su N-dopirani uzorci CQDs bili smeđe obojeni. Smatra se da smeđa boja i karakterističan miris, koji podsjeća na karamelu, potječe od nastalih produkata Maillardove reakcije. Budući da se tijekom sinteze N-CQDs koristi kora klementine, koja je između ostalog bogata i ugljikohidratima, može doći do reakcije kondenzacije između karbonilne skupine ugljikohidrata i amino skupine aminokiseline te nakon niza kemijskih reakcija nastaju produkti Maillardove reakcije, proces poznatiji pod imenom neenzimsko tamnjenje. Tijekom same pripreme CQDs hidrotermalnom sintezom iz biomase, CQDs prolaze kroz pet faza sinteze; toplinska razgradnja, kondenzacija, polimerizacija, karbonizacija i površinska pasivizacija.

Nakon završetka sinteze dobiveni uzorci CQDs su centrifugirani, profiltrirani i izmjeren im je pH nakon sinteze, kao što je prikazano u **Tablici 2.**, dok je pH prije sinteze izmjeren neposredno prije stavljanja uzorka u autoklav. Prije procesa pročišćavanja bilo je bitno podesiti pH pripremljenog uzorka na optimalnih pH = 7, a kako bi se to postiglo, u uzorak kojemu je izmjeren pH nakon sinteze, dodavan je potreban volumen serijski razrijeđene 0,1 M vodene otopine NaOH (ili 0,1 M vodene otopine HCl-a, u slučaju CQD@Arg) do postignuća željenog pH = 7. Sva daljnja mjerenja i analize izvedene su pri optimalnom pH = 7 zato što pri toj pH vrijednosti sustav CQDs homogen i optimalan je pH za pročišćavanje postupkom dijalize.

Tablica 2. Prikaz pH vrijednosti uzoraka CQDs dobivenih iz kore klementine, prije i nakon hidrotermalne sinteze.

Uzorak	pH prije sinteze	pH nakon sinteze
$blank_{CITRUS}$	4,82	3,90
CQD@Leu	4,96	5,76
CQD@Trp	5,48	5,01

CQD@Arg	9,62	7,29
CQD@Ala	4,83	6,52
CQD@His	7,01	6,14

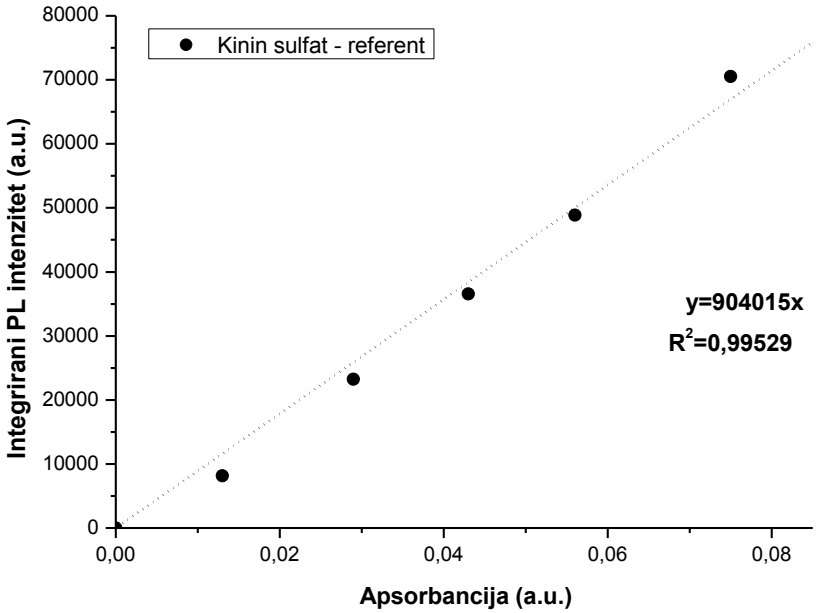
Kako bi se pripremljene N-dopirane CQDs mogle učinkovito koristiti za daljnje analize, bitno ih je pročistiti. Korištena metoda pročišćavanja bila je dijaliza pomoću membrana za dijalizu MWCO 1 kDa. Pripremljeni uzorak CQDs, volumena 20 mL otpipetira se u membranu za dijalizu, koja je jednim svojim krajem pričvršćena plastičnom kvačicom, zatim se i drugi kraj pričvršćuje kvačicom te se membrana uranja u čašu ispunjenu 1 L Milli-Q vode i sadržaj čaše se miješa na magnetskoj miješalici, kao što je prikazano na **Slici 6.**. Dijaliza se odvijala tijekom 48 sati, budući da se taj vremenski interval pokazao kao dovoljno vrijeme dijalize za uklanjanje većine nečistoća i nusproizvoda.

6.1. Kemijska i optička karakterizacija dobivenih CQDs

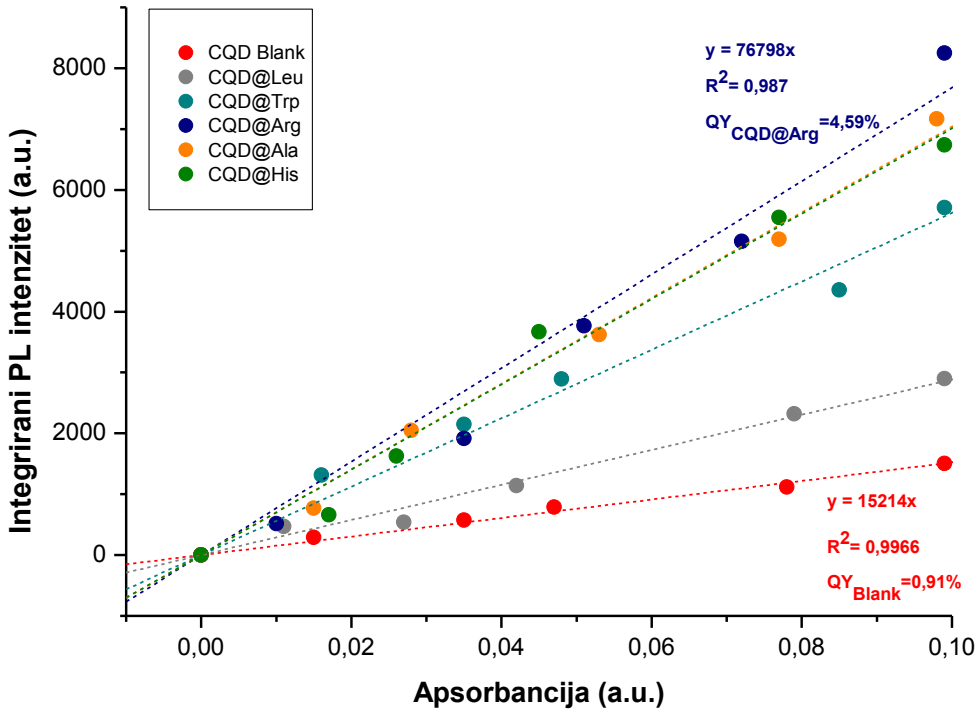
Nakon pročišćavanja uzoraka CQDs, spektrofotometrijskim mjerenjima izmjerena je apsorbancija uzoraka, pri valnoj duljini pobude, λ = 360 nm. Mjerenja su izvođena uz serijska razrijeđenja uzoraka CQDs, koristeći Milli-Q vodu, u svrhu dobivanja uzoraka s rasponom apsorbancije od 0,1 do 0,08. Prilikom mjerenja bilo je bitno da vrijednost apsorbancije ne prijeđu 0,1, kako ne bi došlo do reapsorbancije [52].

Nadalje, CQDs uzorcima poznate vrijednosti apsorbancije, spektrofluorimetrijskim mjerenjima izmjeren je intenzitet fotoluminescencije pri valnoj duljini ekscitacije λ = 360 nm.

Kako bi se izračunalo kvantno iskorištanje (QY), korišten je kinin sulfat kao referentni standard poznatog kvantnog iskorištenja (φ_{QS} = 54 %), kao što je prikazano na **Slici 7.A**. Zatim je određena ovisnost integriranog intenziteta fluorescencije o apsorbanciji CQDs uzoraka (λ_{EX} = 360 nm). Kao što je prikazano na **Slici 7.B** dobiveni pravci pokazali su linearnu ovisnost integriranog intenziteta fluorescencije o apsorbanciji CQDs uzoraka.



Slika 7. A) *Ovisnost integriranog intenziteta fluorescencije o apsorbanciji referentnog standarda – kinin sulfata (λ_{EX} = 360 nm).*



Slika 7. B) *Ovisnost integriranog intenziteta fluorescencije o apsorbanciji CQDs uzoraka (λ_{EX} = 360 nm).*

Koristeći kinin sulfat kao referenti standard (φ = 54 %) i dobivene vrijednosti regresijskih pravaca, izračunato je kvantno iskorištenje svih CQDs uzoraka i prikazano u **Tablici 3.**.

Tablica 3. Prikaz svih pripremljenih CQDs s određenim vrijednostima kvantnog iskorištenja.

Uzorak	**Kvantno iskorištenje (%) pri 360 nm**
Blank	0,91
CQD@Leu	1,72
CQD@Trp	3,35
CQD@Arg	4,59
CQD@Ala	4,20
CQD@His	4,19

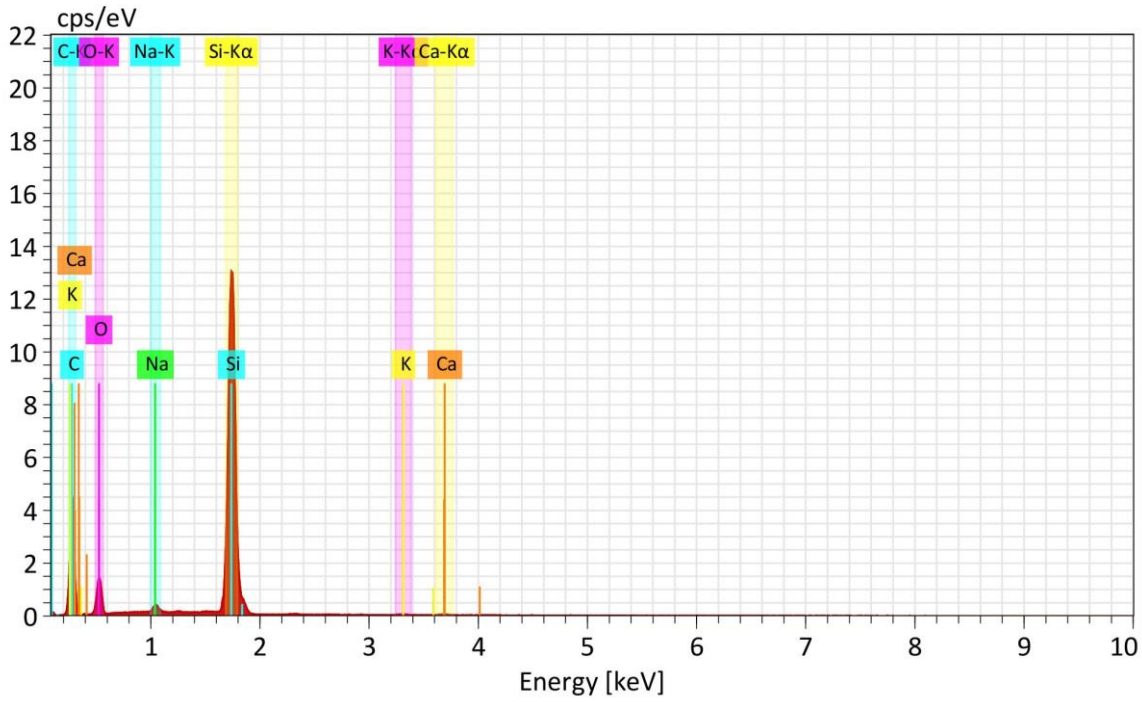
Do sada objavljeni radovi izvještavaju kako čiste nedopirane CQDs dobivene iz biomase imaju relativno nisko kvantno iskorištenje, kao što je slučaj i u ovom radu, u **Tablici 3.** prikazano je kvantno iskorištenje blank uzorka pri 360 nm koje iznosi 0,91 %. Dok je najviše kvantno iskorištenje kod N-dopiranih CQDs pri 360 nm pokazao CQD@Arg i iznosi 4,59 %.

Prema elementarnoj analizi (EDS), blank uzorak koji je pripremljen kao referentni sustav sastoji se uglavnom od ugljika (74,05 %) i kisika (24,45 %), a prisutnost dušika nije otkrivena, kao što je prikazano u **Tablici 4.** i na **Slici 8. (A)**. Dodatkom aminokiselina, došlo je do ugradnje dušika u strukturu CQDs, a iz **Tablice 4.** je vidljivo kako je dodatak aminokiseline Arg rezultirao najvišim povećanjem sadržaja dušika od 11,01 %. Stoga se tvrdnja da površinska pasivizacija igra bitnu ulogu u poboljšanju optičkih i kemijskih svojstava, pokazala točnom budući da je uzorak CQD@Arg, uzorak s najvećim sadržajem dušika, pokazao najbolje kvantno iskorištenje pri 360 nm, QY = 4,59 %. Stoga je CQD@Arg, uzorak s najvišim kvantnim iskorištenjem korišten u svim daljnjim analizama.

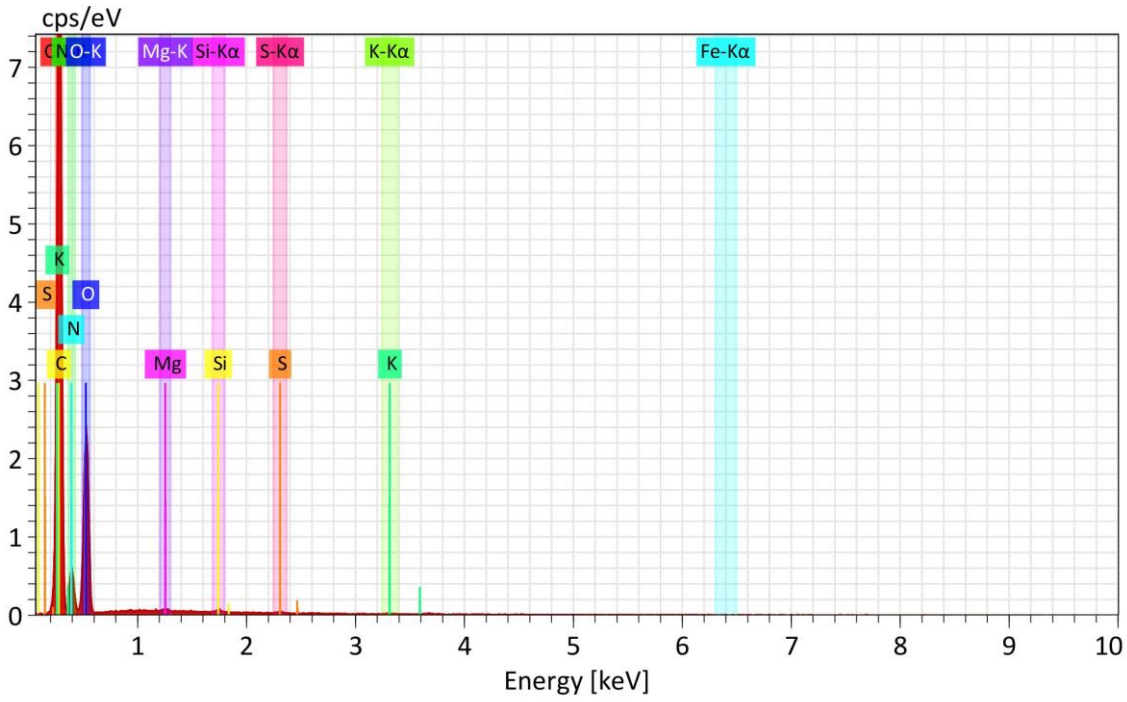
Tablica 4. Elementarna analiza pripremljenih uzoraka CQDs iz kore klementine.

	Maseni udio %			**Atomski udio %**		
Uzorak	**C (%)**	**O (%)**	**N (%)**	**C (%)**	**O (%)**	**N (%)**
Blank$_{CITRUS}$	66,83	29,50	-	74,05	24,45	-
CQD@Arg	57,84	6,69	11,60	63,99	24,66	11,01
CQD@His	56,25	28,96	9,77	63,54	24,55	9,46
CQD@Ala	57,87	31,40	7,17	65,09	26,51	6,91
CQD@Trp	60,13	28,83	3,56	68,74	24,74	3,49
CQD@Leu	67,79	24,13	3,23	74,96	20,03	3,23

Nadalje, EDS spektri prikazani na **Slici 8. (A)** i na **Slici 8. (B)** pokazuju prisutnost minerala. Naime, minerali poput: kalcija, kalija, natrija, silicija, sumpora, magnezija i željeza se mogu naći u tragovima budući da su prirodno prisutni u kori citrusa.



Slika 8. (A) *EDS spektar pripremljenog blank uzorka CQDs.*



Slika 8. (B) *EDS spektar pripremljenog uzorka CQD@Arg.*

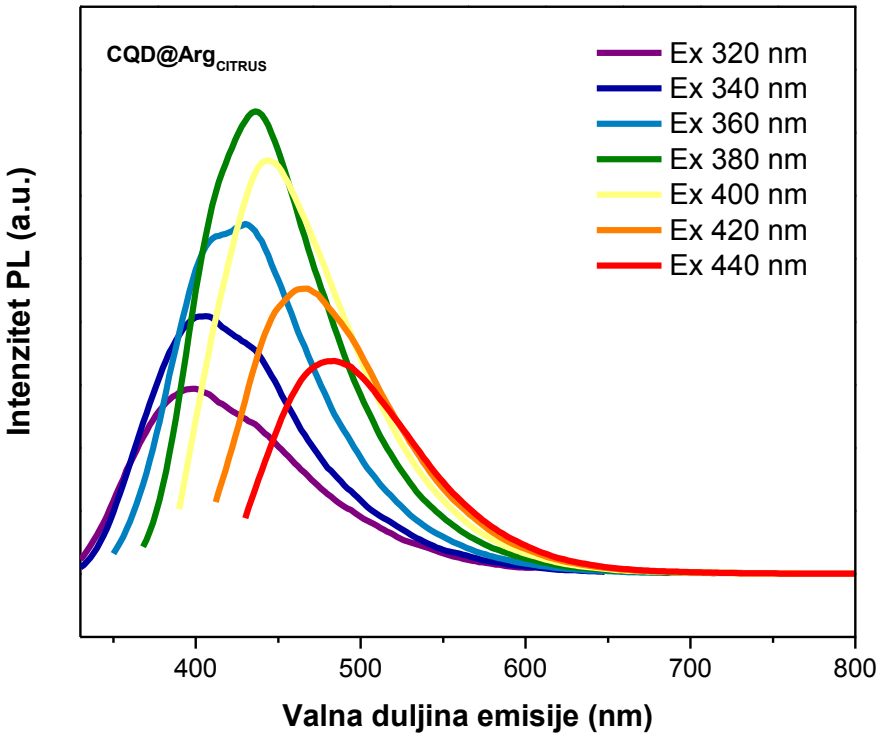
Nadalje, svim uzorcima CQDs određena je maksimalna valna duljina emisije fotoluminescencije pri istoj valnoj duljini pobude od λ_{EX} = 380 nm, a dobiveni rezultati su navedeni u **Tablici 5.**.

Tablica 5. Prikaz svih pripremljenih CQDs s odgovarajućom Max $\lambda_{EM}/\lambda_{EX}$.

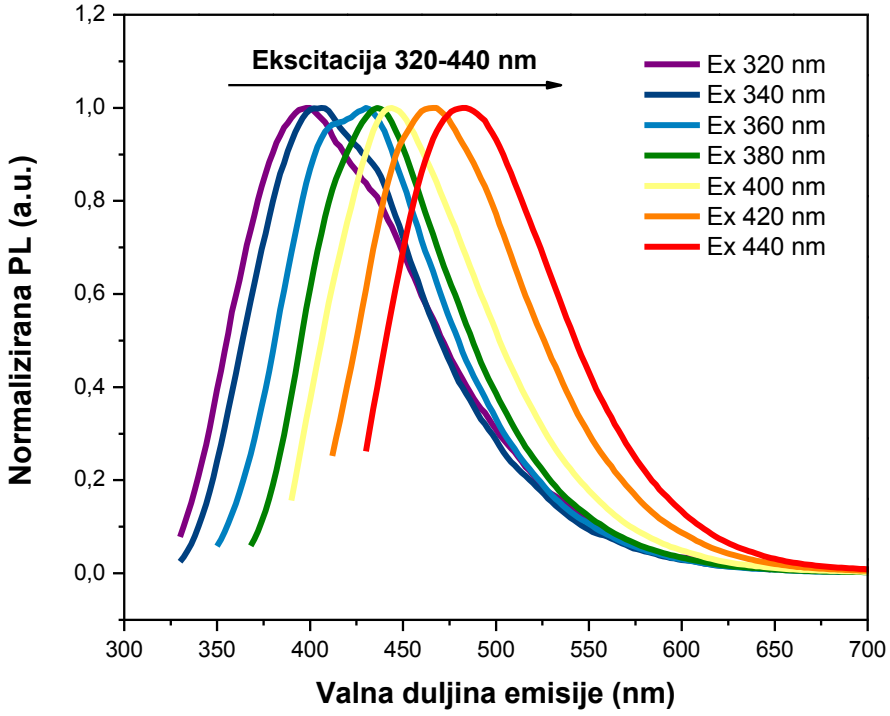
Uzorak	**Max λ_{EM} / λ_{EX}**
Blank	465/380 nm
CQD@Leu	460/380 nm
CQD@Trp	453/380 nm
CQD@Arg	436/380 nm
CQD@Ala	440/380 nm
CQD@His	437/380 nm

Kako bi se opisala ovisnost intenziteta fotoluminescencije o valnoj duljini pobude, snimljeni su spektri emisije fluorescencije CQD@Arg pri različitim valnim duljinama ekscitacije kao što je prikazano na **slikama 9.** i **10.**. Na **Slici 9.** uočava se da je intenzitet emisije fotoluminescencije

CQD@Arg najveći pri valnoj duljini ekscitacije od 380 nm i iznosi 436 nm, a daljnjim povećanjem valne duljine ekscitacije dolazi do smanjenja intenziteta fotoluminescencije CQD@Arg. Na **Slici 10.** je vidljivo kako se s povećanjem valne duljine ekscitacije od 320 nm do 440 nm, pomiče maksimum valne duljine emisije od 398 nm do 484 nm. Obzirom na dobivene rezultate, vidljiv je pomak valne duljine emisije prema crvenom području. No, budući da nije došlo do jako velikog pomak valne duljine emisije, emisija CQDs je samo blago pomaknuta iz plavog u zeleno područje emisije. Moguć uzrok ne-dobivanja stabilnih CQD@Arg čestica s emisijom u crvenom dijelu spektra (625 nm – 740 nm) krije se u procesu sinteze. Naime, tijekom sinteze i prilikom faze karbonizacije, vrlo vjerojatno nije došlo do potpune karbonizacije, budući da su uvjeti sinteze bili nešto blaži (180 °C, 9 h). Stoga su nastale čestice CQD@Arg imale niže kvantno iskorištenje i emisiju u plavom dijelu spektra. Takve pripremljene čestice su pogodne kao nanoprobe za detekciju metalnih iona, ali ne i za *bioimaging*. Zato što im je valna duljina emisije preniska, a to bi moglo inducirati nastanak oštećenja stanica, budući da za *bioimaging* pogoduje zračenje više valne duljine, bliže bliskom infracrvenom području.



Slika 9. *Spektri emisije fluorescencije CQD@Arg pri različitim valnim duljinama pobude u rasponu od 320 nm do 440 nm (povećanja od 20 nm).*

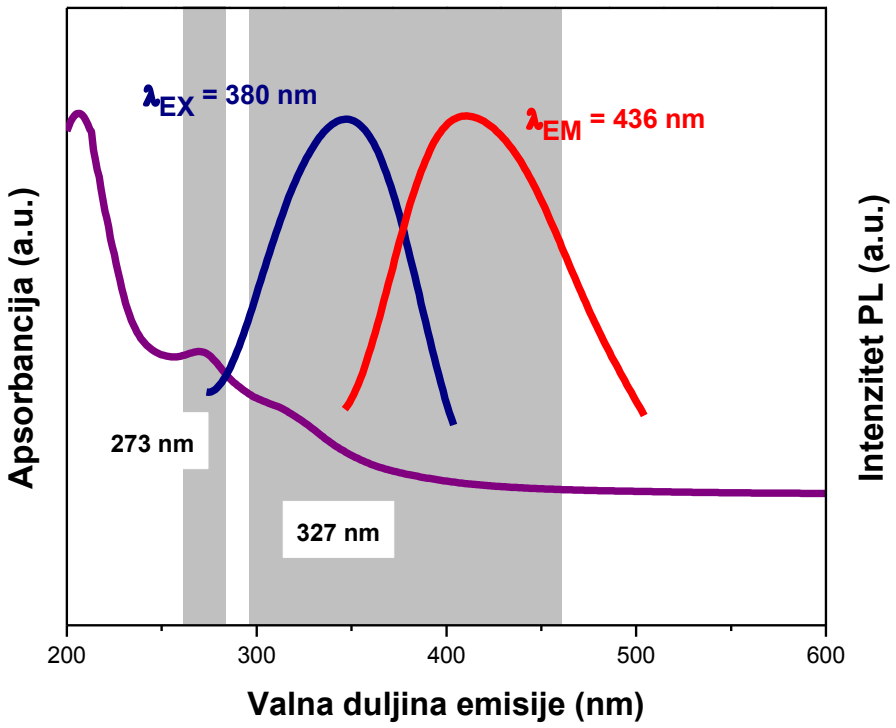


Slika 10. *Normalizirani spektri emisije fluorescencije CQD@Arg pri različitim valnim duljinama pobude u rasponu od 320 nm do 440 nm.*

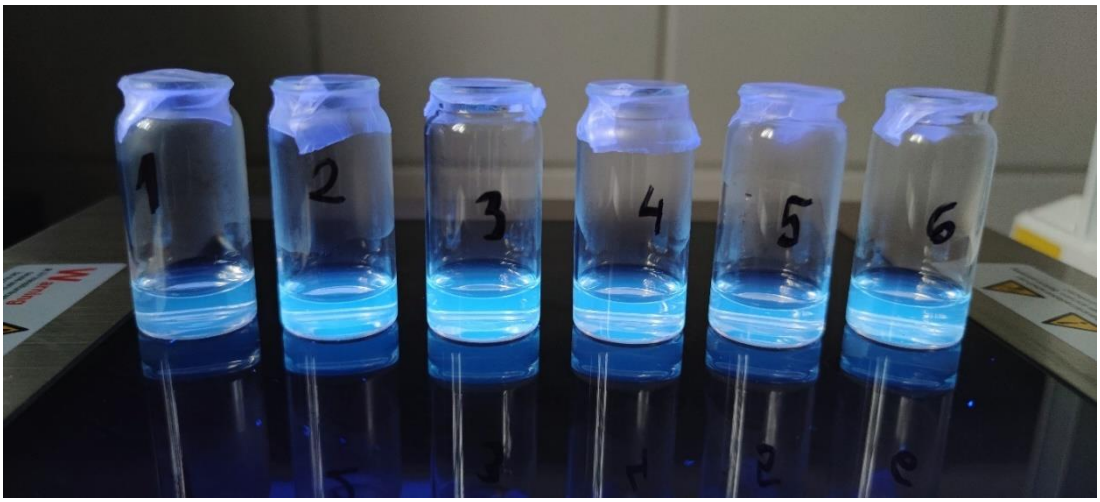
Bitna karakteristika CQDs je da pokazuju jako izraženu apsorpciju u UV području, ali s obzirom na korištene prekursore i metode sinteze, izgled UV-Vis spektra može varirati. Većina znanstvenih radova navodi kako CQDs posjeduju 2 karakteristična apsorpcijska pika [6,25,32,52]. Kao što je vidljivo na **Slici 11.** u UV dijelu UV-Vis spektra prisutna su 2 slaba apsorpcijska pika na 273 nm i 327 nm. Pik na 273 nm posljedica je π-π* prijelaza C=C veze i upućuje na prisutnost sp^2-hibridiziranog ugljika, uređene strukture, odnosno kristalične prirode. Drugi pik na 327 nm posljedica je n-π* prijelaza, odnosno kisikovi nespareni elektroni iz C=O veze pobudom prelaze u π* protuveznu orbitalu.

Nadalje, još posebnija karakteristika CQDs zasigurno je njihova sposobnost fotoluminescencije. Mjerenjem fluorescencije uzorka CQD@Arg, izmjerena je maksimalna valna duljina emisije na $\lambda_{EM} = 436$ nm, pri valnoj duljini ekscitacije $\lambda_{EX} = 380$ nm, što odgovara području emisije plave svjetlosti. Kako bi se dodatno potvrdila ta tvrdnja, svi pripremljeni

uzorci su stavljeni ispod UV lampe i pobuđeni svjetlošću, λ = 365 nm i kao što je prikazano na **Slici 12.**, svi su emitirali plavu fluorescenciju.

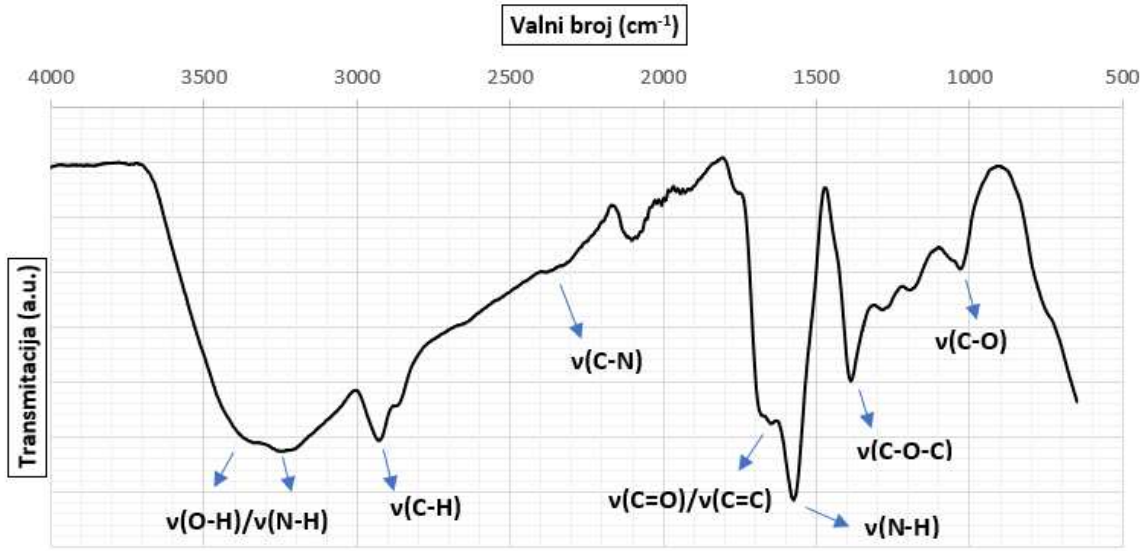


Slika 11. *UV-Vis apsorpcijski spektar s maksimalnom ekscitacijom fluorescencije i spektrom emisije uzorka CQD@Arg.*



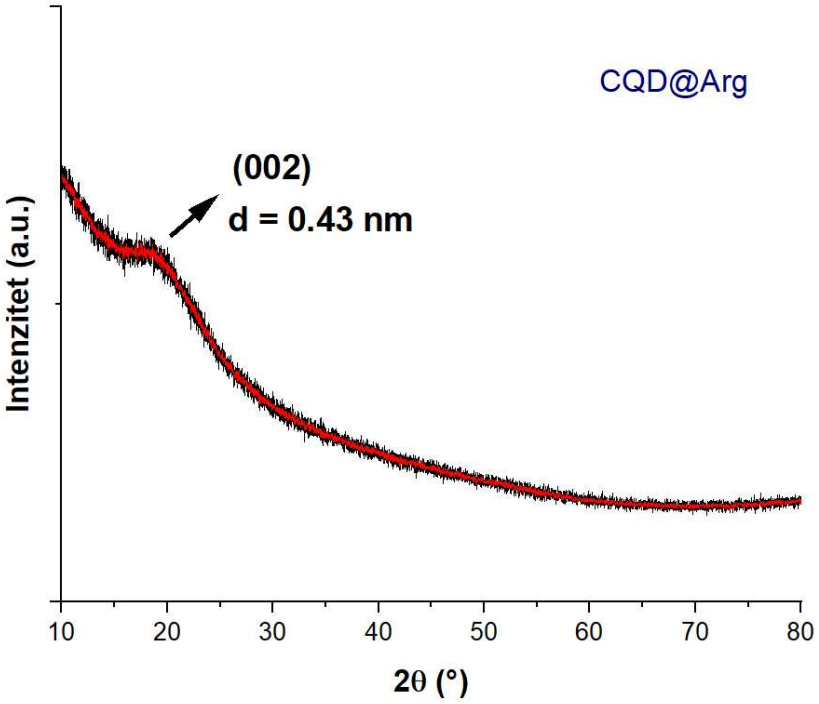
Slika 12. *CQDs izložene UV svjetlosti valne duljine 365 nm, uzorci; 1) blank, 2) CQD@Leu, 3) CQD@Trp, 4) CQD@Arg, 5) CQD@Ala, 6) CQD@His* [autor].

Kako bi se utvrdila prisutnost karakterističnih funkcijskih skupina poput; karboksilnih, hidroksilnih i amino, na površini uzorka CQD@Arg, korištena je FT-IR spektroskopija, kao što je prikazano na **Slici 13.** Prisutnost širokih pikova u području 3340-3258 cm^{-1} upućuje na postojanje i prisutnost N-H i O-H funkcijskih skupina. Oštar pik na 2928 cm^{-1} potječe od C-H istezanja. Slab pik na 2380 cm^{-1} ukazuje na prisutnost C≡N istezanja. Široki pik u području 1670-1650 cm^{-1} pripisuje se rasteznoj vibraciji C=O i mogućoj prisutnosti nezasićenih C=C vibracija stvorenih unutar jezgre CQDs. Oštar pik na 1577 cm^{-1} potječe od savijanja N-H veze. Oštar pik na 1389 cm^{-1} ukazuje na C-O-C istezanja. Apsorpcijski vrh pri 1032 cm^{-1} pripisuje se vibracijama istezanja C-O veze. Obzirom na navedene rezultate FT-IR spektra potvrđena je prisutnost i hidroksilnih i karbokislnih i amino skupina na površini uzorka CQD@Arg.



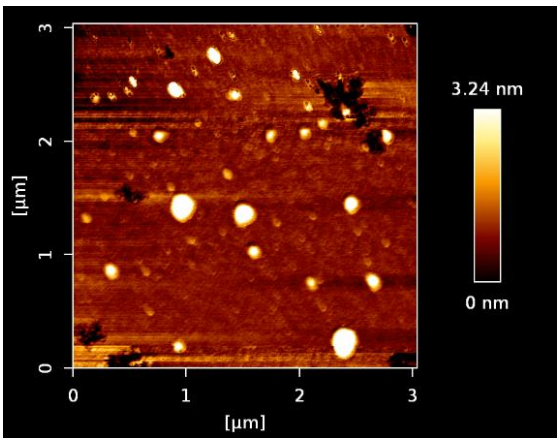
Slika 13. *FT-IR spektar uzorka CQD@Arg.*

Analizirana je i površina uzorka CQD@Arg snimanjem difraktograma rentgenskom difrakcijom na prahu. Budući da je za provedbu te analize potreban praškasti uzorak, prethodno otpareni uzorak CQD@Arg je dodatno osušen kako bi se uklonila zaostala voda u uzorku. Rezultati PXRD analize, prikazani na **Slici 14.**, pokazali su široki difrakcijski vrh na $2\theta = (20{,}16 \pm 0{,}48)°$ što odgovara (002) ravnini i ukazuje na amorfnu strukturu pripremljenog uzorka CQD@Arg. Nadalje amorfna struktura i niži stupanj kristaličnosti, uzrokovan funkcionalizacijom površine potvrđen je postojanjem šireg međuslojnog razmak od (0,43 ± 0,01) nm, za usporedbu on kod grafita iznosi 0,34 nm. Difrakcijski vrh niske gustoće nije detektiran.

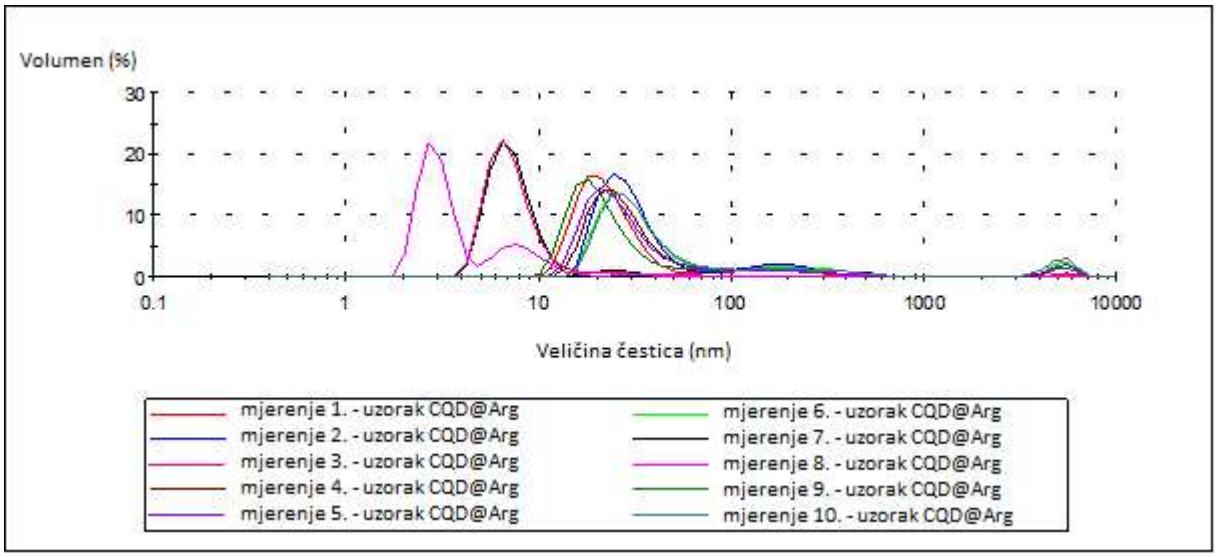


Slika 14. *PXRD spektar uzorka CQD@Arg.*

Prosječna veličina i morfologija čestica uzorka CQD@Arg određena je AFM sustavom za mikroskopiju. Kao što se može vidjeti na **Slici 15.**, morfologija sintetiziranih CQD@Arg je gotovo sferična. Maksimalna detektirana visina CQDs iznosila je ≈3,24 nm. Nadalje, AFM je potvrdio kako su CQDs čestice, nanometarske čestice, iako su vidljivi i veći agregati. Prisutno je postojanje agregata koji daju čestice promjera >30 nm, ali je na snimci također vidljiva prisutnost polimernog materijala koji može biti produkt termalnog tretiranja biljnog materijala. Međutim, preliminarni rezultati DLS analize upućuju na postojanje i manjih čestica (**Slika 16.**).



Slika 15. *AFM CQD@Arg.*



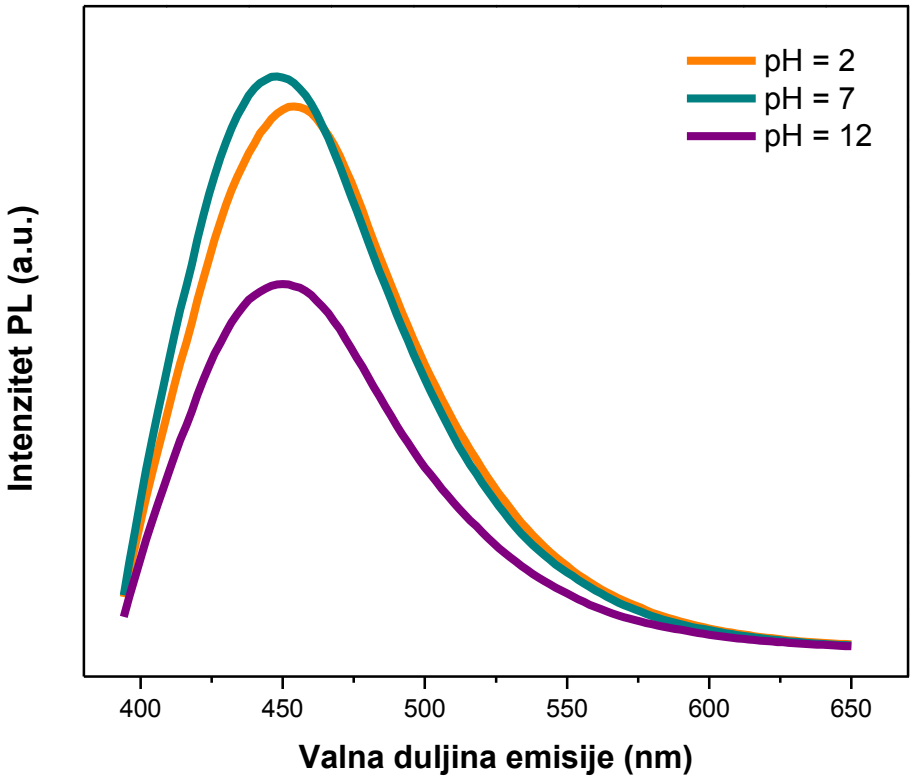
Slika 16. *Graf distribucije veličine CQD@Arg po volumenu.*

Slika 16. potvrđuje rezultate AFM mikroskopije i pokazuje kako su najzastupljenije čestice veličine oko 30 nm. Međutim, mjerenje 8. je detektiralo CQD@Arg veličine oko 4 nm, a mjerenje 7. CQD@Arg veličine oko 8 nm. Također je vidljivo postojanje čestica veličine od 15 do 20 nm. Detektirano je i postojanje jako velikih agregata u malom postotku, veličine oko 8000 nm, potencijalno zbog agregacije i sedimentacije.

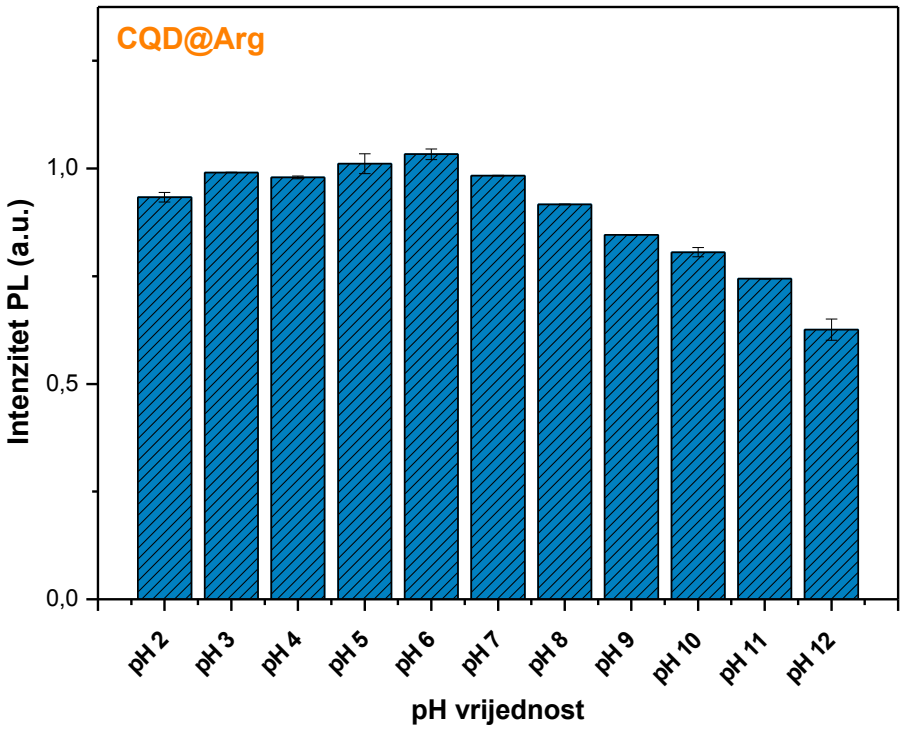
Intenzitet emisije fotoluminescencije uzorka CQD@Arg, pri valnoj duljini pobude (λ_{EX} = 380 nm) ovisan je o pH vrijednosti medija u kojem se uzorak nalazi, kao što je prikazano na **Slici 17.**. Spomenuta ovisnost je bolje prikazana na **Slici 18.**, u obliku stupičastog dijagrama, pomoću kojeg se može vidjeti da nije bilo značajnih promjena u intenzitetu fotoluminescencije uzorka CQD@Arg u rasponu pH vrijednosti, od pH = 3,0 do pH = 7,0, dok je značajno smanjenje intenziteta primjećeno pri pH = 12,0.

Mjerenjem ovisnosti zeta potencijala o promjeni pH vrijednosti utvrđena je promjena zeta potencijala od 3,71 ± 1,1 mV do -65,37 ± 3,68 mV, što ukazuje da je došlo do promjena na površini uzorka CQD@Arg. Budući da su na površini uzorka CQD@Arg prisutne funkcionalne skupine poput; karboksilne, hidroksilne i amino, najvjerojatnije je došlo do ionizacije površina funkcionalnih skupina. Pomoću dijagrama ovisnosti zeta potencijala o promjeni pH vrijednosti, procijenjena je pH vrijednost izoelektrične točke na pI = 2,14. Pri pH vrijednosti nižoj od pI uzorak CQD@Arg je protoniran te posjeduje pozitivan neto naboj na površini, dok s porastom pH vrijednosti, iznad pI = 2,14, točnije u lužnatim uvjetima, CQD@Arg stvara negativan neto

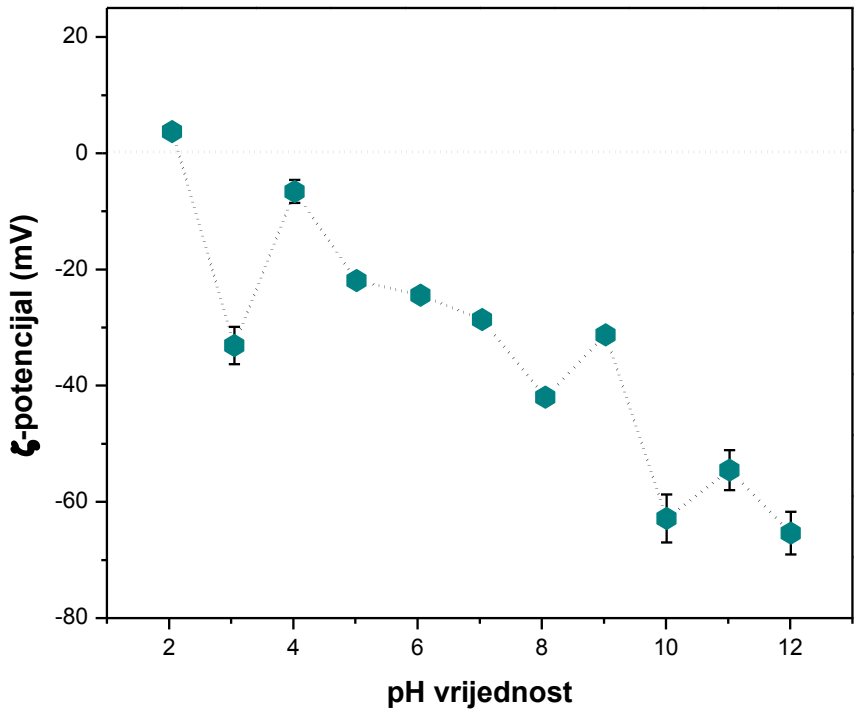
naboj na površini zbog deprotonacije karboksilnih skupina i rezultira rastom negativne vrijednosti zeta potencijala. Također je vidljiva nagla promjena zeta potencijala između pH = 9 i pH = 10, moguće objašnjenje takvog naglog skoka ka još negativnijim vrijednostima je potpuna deprotonacija amino skupina i dodatno povećanje negativnog neto naboja na površini.



Slika 17. *Spektri emisije fotoluminescencije CQD@Arg na različitim pH vrijednostima, pri valnoj duljini pobude* λ_{EX} *= 380 nm.*

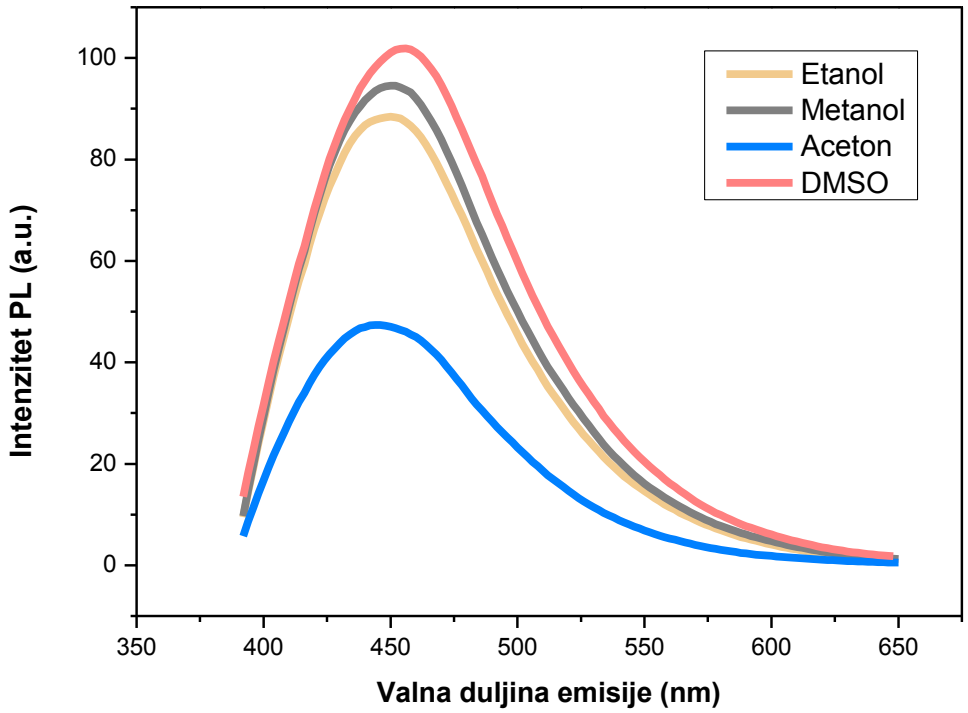


Slika 18. *Ovisnost intenziteta fotoluminescencije o promjeni pH vrijednosti.*

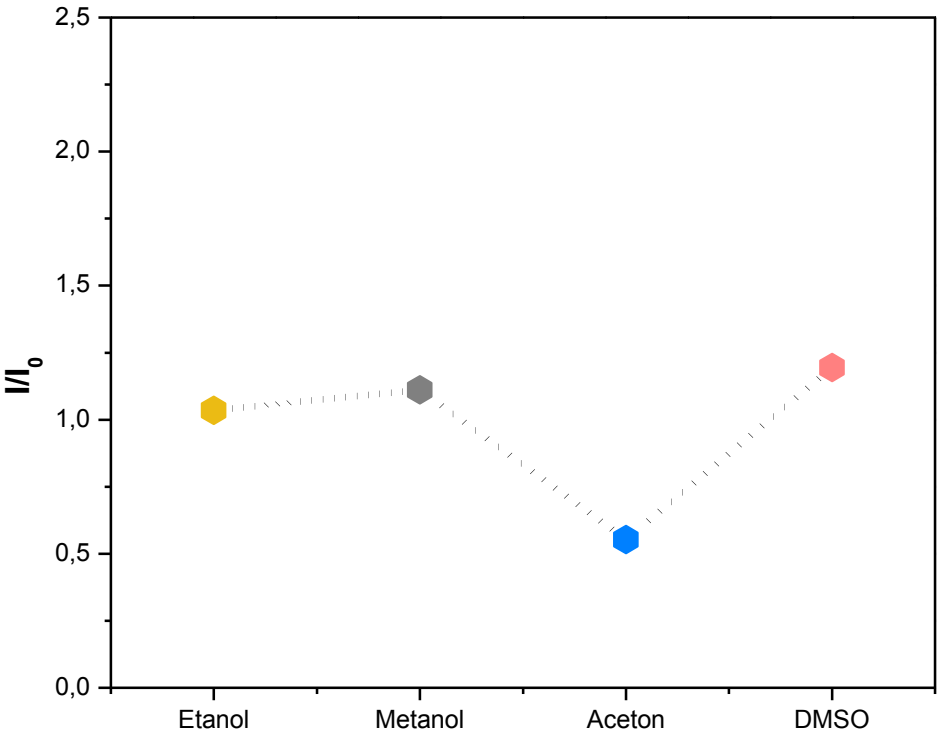


Slika 19. *Promjena ζ-potencijala kao funkcije pH vrijednosti.*

Spektrofluorimetrijskim mjerenjima ispitan je učinak različitih otapala na intenzitet fotoluminescencije CQD@Arg, kao što je prikazano na **Slikama 20.** i **21.**. Uzorak CQD@Arg pokazuje dobru disperzibilnost u polarnim protičnim otapalima kao što su etanol i metanol, dok je s druge strane izraženo manja disperzibilnost uočena u polarnom aprotonskom otapalu acetonu. Zanimljivo je da je dobra disperzibilnost CQD@Arg nanočestica postignuta u polarnom aprotonskom otapalu DMSO-u (dimetil sulfoksid) [52]. Razlika između protičnih i aprotičnih otapala je mogućnost doniranja protona u vodikovu vezu, stoga protično otapalo poput metanola ili etanola može donirati proton iz svoje hidroksilne skupine, dok aprotično otapalo nema tu sposobnost [25]. Također je iz **Slike 20.** vidljivo je da je korištenjem DMSO kao otapala postignut najveći intenzitet emisije fotoluminescencije sa značajnim crvenim pomakom (~19 nm) među ispitivanim otapalima.



Slika 20. *Spektri emisije fluorescencije CQD@Arg u različitim otapalima pri* λ_{EX} *= 380 nm.*



Slika 21. *Intenzitet fluorescencije uzorka CQD@Arg u etanolu, metanolu, acetonu i DMSO.*

6.2. Antiradikalna aktivnost dobivenih CQDs

Kako bi se odredila antiradikalna aktivnost svih pripremljenih uzorka korištena je DPPH metoda. Metoda je detaljnije opisana u **poglavlju 4.2.** (*Antioksidacijska aktivnost i njezina važnost u prehrambenoj industriji i biomedicini*). Cilj korištenja ove metode bio je procjena sposobnosti pripremljenih uzorka CQDs na hvatanje i neutralizaciju slobodnih radikala. Interakcijom antioksidansa odnosno suspenzije CQDs sa slobodnim radikalom DPPH dolazi do promjene boje ispitivanog uzorka iz ljubičaste u žutu [52]. Procjena se vršila korištenjem različitih koncentracija sintetiziranih CQDs u rasponu koncentracija od 0 μg/mL do 100 μg/mL, uz dodatak 50 μM metanolne otopine DPPH, praćenjem promjene boje spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini, $\lambda = 517$ nm. Za što bolju točnost i preciznost metode mjerenja apsorbancije su vršena s tri paralele, u odnosu na slijepu probu.

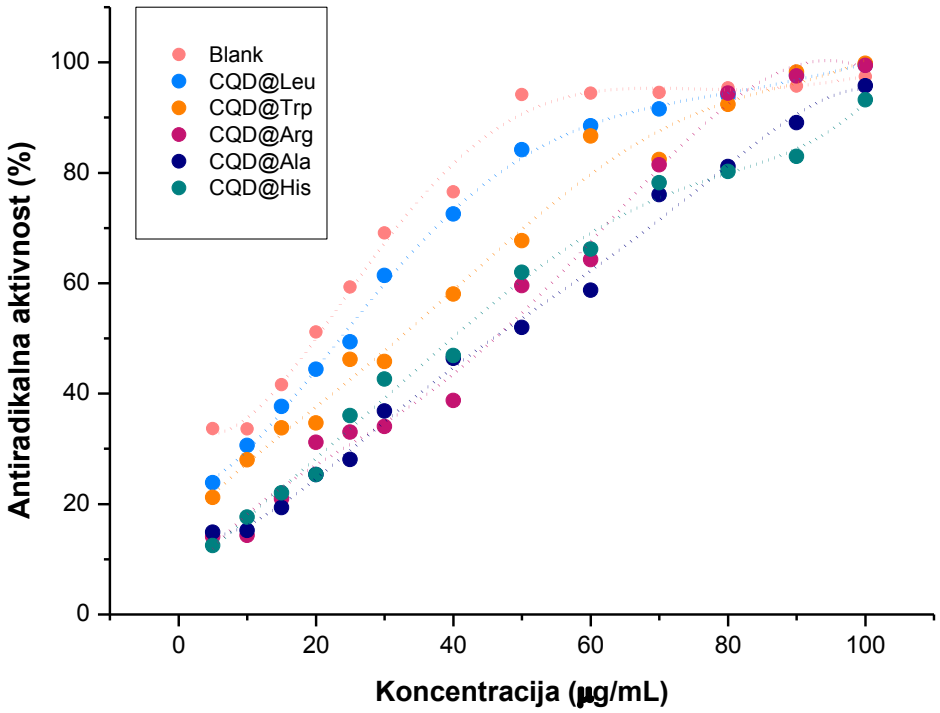
Svi su pripremljeni uzorci pokazali izvrsnu antiradikalnu aktivnost, kao što je prikazano u **Tablici 6.**, a prosjek antiradikalne aktivnosti među svim ispitivanim uzorcima kretao se od

93,22±0,87 % do 99,85±0,26 % pri najvišoj koncentraciji od 100 μg/mL. Koncentracija uzorka koji je izazvao 50%-tno smanjenje aktivnosti DPPH, označena je kao polovina makismalne efektivne koncentracije (EC_{50}) iznosila je 17,94±1,12 μg/mL i utvrđena je kod blank uzorka.

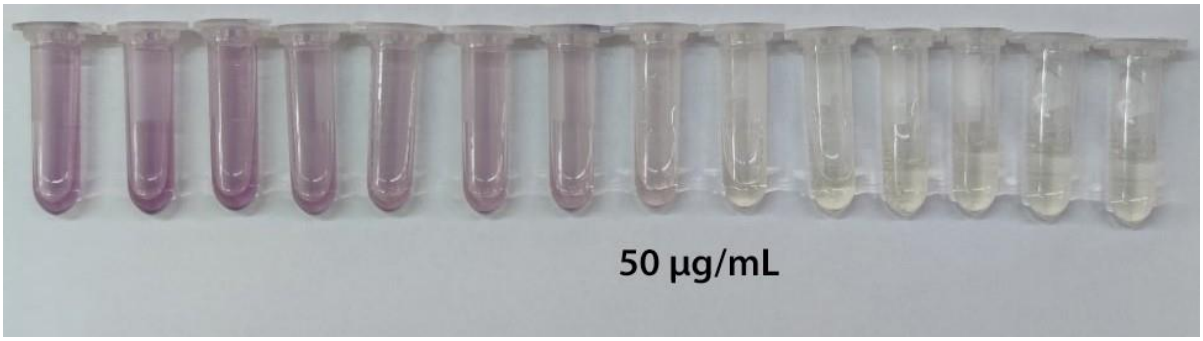
Tablica 6. Antiradikalna aktivnost svih pripremljenih CQDs i vrijednosti EC_{50} pri koncentraciji 100 μg/mL.

Uzorak	**Antiradikalna aktivnost (%) pri 100 μg/mL**	
	(Prosjek±StDev)	EC_{50} (μg/mL)
Blank	97,41±2,59	17,94±1,12
CQD@Leu	97,41±2,59	24,87±0,12
CQD@Trp	99,85±0,26	32,14±1,45
CQD@Arg	99,43±0,46	42,35±2,47
CQD@Ala	95,70±0,11	49,01±0,77
CQD@His	93,22±0,87	42,11±1,13

Slika 22. pokazuje sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala metanolnih suspenzija CQDs u rasponu koncentracija od 0 μg/mL do 100 μg/mL. Pri koncentraciji 100 μg/mL vidljiva je podjednaka antiradikalna aktivnost, što je prethodno i navedeno u **Tablici 6.**. Razlika je vidljiva pri nižim koncetracijama, npr. pri koncetraciji 50 μg/mL blank uzorak pokazuje 94 %-tnu inhibiciju slobodnih radikala, dok CQD@Ala samo 52 %-tnu. Odlična sposobnost inhibicije blank uzorka prikazana je na **Slici 23.**, gdje je vidljiva promjena boje iz ljubičaste u žutu prilikom interakcije blank uzorka sa slobodnim radikalom iz DPPH, pri koncentraciji 50 μg/mL.

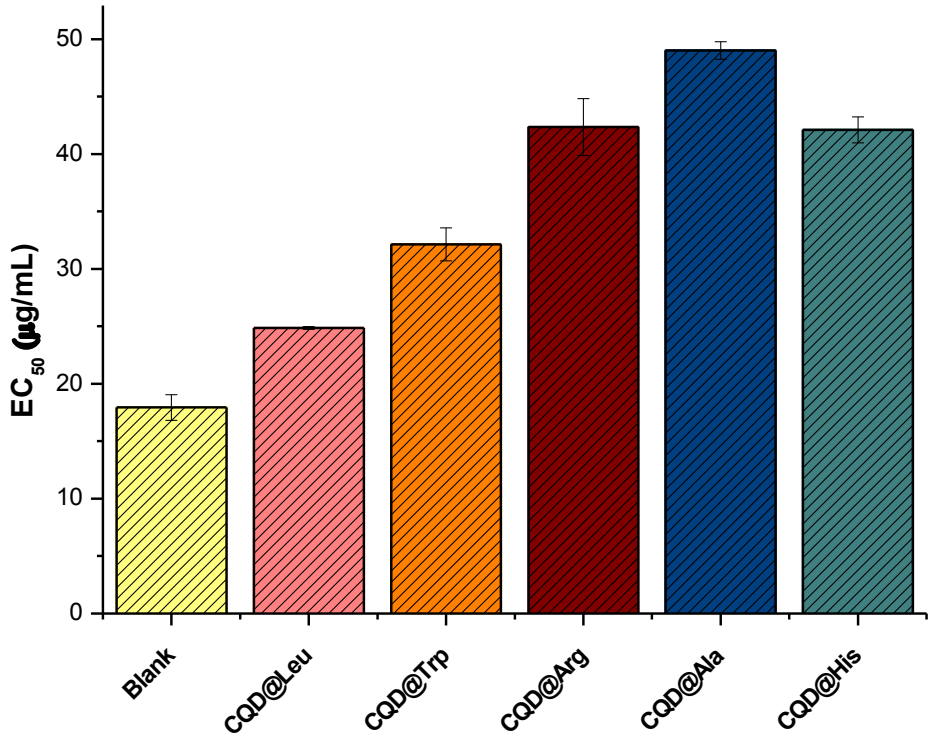


Slika 22. *Određivanje antiradikalne aktivnosti svih sintetiziranih CQDs pri različitim koncentracija.*



Slika 23. *Antiradikalna aktivnost blank uzorka u rasponu koncentracija od 0 do 100 µg/mL i prikaz postizanje gotovo potpune inhibicije pri 50 µg/mL* [autor].

Na **Slici 24.** prikazani su stupićasti dijagrami EC_{50}, kao što je navedeno u **Tablici 6.**, blank uzorak pokazuje najbolju vrijednost EC_{50} pri već 17,94±1,12 µg/mL.

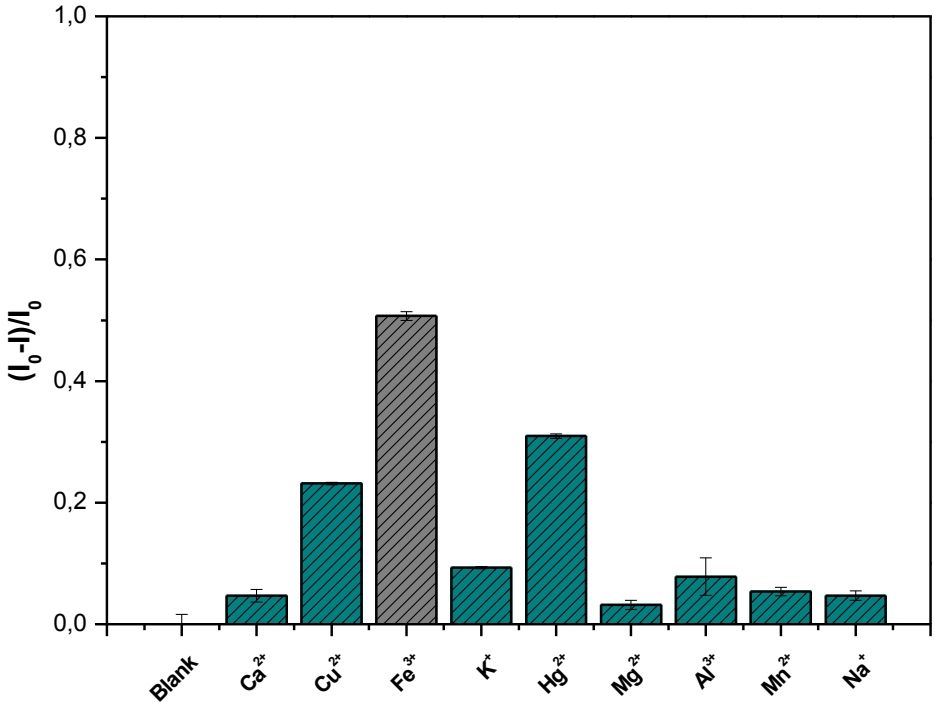


Slika 24. *Polovina makismalne efektivne koncentracije (EC_{50}) redom navedenih CQDs.*

6.3. Selektivnost i detekcija metalnih iona primjenom dobivenih CQDs

Kako bi se procijenila selektivnost dobivenog uzorka CQD@Arg prema metalnim ionima, analiziran je fluorescencijski odgovor CQD@Arg na različite metalne ione, kao što je prikazano na **Slici 25.**, gdje su I_0 i I intenziteti fotoluminescencije suspenzije CQD@Arg u odsutnosti i prisutnosti različitih metalnih iona, redom navedenih, pri λ_{EX} = 360 nm. Rezultati prikazani na **Slici 25.**, su pokazali visoku osjetljivost i selektivnost za detekciju Fe^{3+} iona, prigušenjem signala fluorescencije >50 % u usporedbi sa slijepom probom. Primijećeno je blago prigušenje intenziteta fluorescencije dodatkom Cu^{2+} iona i Hg^{2+} iona, >20 % za Cu^{2+} i oko 30 % za Hg^{2+} u usporedbi sa slijepom probom. Budući da su CQD@Arg N-dopirane fluorescentne nanoprobe najvjerovatnije je došlo do stvaranja N-CQD-Cu^{2+} kompleksa, odnosno N-CQD-Hg^{2+}, stvoreni kompleks je olakšao prijenos naboja i smirio radijativnu rekombinaciju eksitona što je dovelo do prigušenja intenziteta fluorescencije. Zbog velikog prisutstva hidroksilnih, karboksilnih i amino skupina na površini CQD@Arg, površina ima puno veći afinitet prema Fe^{3+} ionima.

Naime, interakcijom Fe^{3+} iona sa spomenutim funkcionalnim skupinama može doći do prijelaza elektrona iz pobuđenog stanja s površine CQD@Arg u polupopunjenu 3d orbitalu Fe^{3+} iona što rezultira prigušenjem intenziteta fluorescencije [32,52]. Iako Fe^{3+} ioni imaju visoku sposobnost prigušenja signala fotoluminescencije, daljnja primjena CQD@Arg kao učinkovitih i selektivnih nanoprobi u realnim uzorcima vode nije moguća, budući da nisu visoko osjetljivi i selektivni samo pri detekciji Fe^{3+} iona.



Slika 25. *Fluorescencijski odgovor CQD@Arg na različite metalne ione*.

7. ZAKLJUČAK

Svjesni smo kako se svakodnevno razvijaju nove tehnologije koje bi čovjeku omogućile unaprjeđeniji i bolji život. Brojni su preduvjeti koje je potrebno zadovoljiti u razvoju nečeg novog, ponajviše kako bi se ideja na kraju sprovela u djelo. U današnje vrijeme ponajviše se cijeni jednostavnost, učinkovitost i niski troškovi prilikom razvoja inovacija, ali se konačno u prvi plan stavljaju ekološki aspekti.

U samim početcima razvoja metoda sinteze ugljikovih kvantnih točaka korišteni su dugotrajni postupci poput laserske ablacije, elektrokemijske i kemijske oksidacije, koji su zahtijevali relativno zahtjevne uvjete, poput visoke temperature i tlaka, samim time i velik utrošak toplinske energije, a nerijetko i skupe polazne sirovine. Stoga se teži razvoju metoda koje će u što blažim uvjetima, uz što ekonomski isplativije i dostupnije sirovine dati što bolja iskorištenja reakcija. Cilj ovog diplomskog bio je iskoristiti nusproizvod prehrambene industrije, odnosno otpadni dio klementine kako bi se razvio biokompatibilni nanomaterijal visoke učinkovitosti.

Jednostavnom, jeftinom i ekološki prihvatljivom hidrotermalnom sintezom (uvjeti; 180 °C, 9 h) uspješno su pripremljene CQDs dopirane dušikom. Biomasa je korištena kao polazna sirovina u sintezi, uz dodatak 5 aminokiselina (Leu, Trp, Arg, Ala, His) kao dopanti dušika. Pripremljen je i referenti sustav, bez dopiranja dušikom, označen kao blank sustav. Fizikalno-kemijskom i optičkom karakterizacijom proučavane su sličnosti i razlike između pripremljenih CQDs. Dopiranje aminokiselinama rezultiralo je ugradnjom dušika u strukturu CQDs, što je potvrđeno EDS analizom. Najveće kvantno iskorištenje imao je CQD@Arg (QY = 4,59 %). Uzorak koji je ujedno pokazivao 2 karakteristična apsorpcijska pika u UV dijelu UV-Vis spektra i maksimalnu valnu duljinu emisije fotoluminescencije λ_{EM} = 436 nm, pri valnoj duljini pobude λ_{EX} = 380 nm. Također je korištenjem FTIR spektroskopije potvrđena prisutnost karakterističnih funkcijskih skupina (hidroksilnih, karboksilnih, amino) na površini CQD@Arg uzorka. PXRD analiza je utvrdila amorfnu strukturu CQD@Arg, a AFM gotovo sferične nanometarske čestice. Zeta potencijal je potvrdio postojanje površinskog naboja u suspenzijama CQDs i promjenjivost u ovisnosti o pH vrijednosti. Uočene su razlike prilikom ispitivanja na antiradikalnu aktivnost i selektivnu detekciju metalnih iona. Najveću antiradikalnu aktivnost pokazao je CQD@Trp, DPPH metodom te je određena antiradikalna aktivnost od 99,85±0,26 %, dok je najbolja vrijednost EC_{50} = 17,94±1,12 μg/mL utvrđena kod blank uzorka. Nadalje N-dopirane CQDs su uspješno korištene kao fluorescentne nanoprobe prilikom detekcije metalnih iona. Rezultati su pokazali selektivnost prema Fe^{3+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, no iako su Fe^{3+} ioni imali visoku sposobnost prigušenja signala fotoluminescencije, daljnja primjena CQD@Arg kao

učinkovitih nanoprobi u realnim uzorcima vode nije moguća, budući da nisu visoko osjetljivi i selektivni samo pri detekciji Fe^{3+} iona.

8. LITERATURA

1. M. Kragulj, (2013.) Uticaj ugljeničnih nanomaterijala na ponašanje odabranih hidrofobnih organskih jedinjenja u akvatičnim sistemima, Doktorska disertacija, Novi sad; Prirodni-matematički fakultet, Unierzitet u Novom Sadu.
2. Z. Wang, T. Hu, R. Liang, M. Wei, Frontiers in Chemistry 8 (2020), 320: 1-19.
3. S. Šafranko, D. Gašo-Sokač, S. Jokić, Zelene sinteze ugljikovih kvantnih točaka iz biomase – primjena u biomedicini i farmaceutskoj analizi, Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 3. (D. Šubarić, B. Miličević), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, Osijek, Požega, 2021.
4. Y. Liu, H. Huang, W. Cao, B. Mao, Y. Liu, Z. Kang, Materials Chemistry Frontiers, 4 (2020), 1586-1613.
5. N. Javed, D. M. O'Carroll, Nanoscale Advances, 3(1) (2021), 182–189.
6. Y. Wang, A. Hu, Journal of Materials Chemistry C, 2 (2014) 6921-6939.
7. L. Cui, X. Ren, M. Sun, H. Liu, L. Xia, Nanomaterials, 11 (2021), 3419-3431.
8. M. Yahaya Pudza, Z. Zainal Abidin, S. Abdul Rashid, F. Md Yasin, A. S. M. Noor, M. A. Issa, Nanomaterials, 10 (2020), 315-334.
9. K. J. Mintz, Y. Zhou, R. Leblanc, Nanoscale, 11 (2019), 4634-4652.
10. S. Qu, X. Wang, Q. Lu, X. Liu, L. Wang, Angewandte Chemie International Edition, 51(49) (2012), 12215–12218.
11. R. Wang, K.Q. Lu, Z.-R. Tang, Y.-J. Xu, Journal of Materials Chemistry A, 5(8) (2017), 3717–3734.
12. C. Kang, Y. Huang, H. Yang, X. F. Yan, Z. P. Chen, Nanomaterials, 10(11) (2020), 2316-2340.
13. V. L. John, Y. Nair, T. P. Vinod, Particle & Particle Systems Characterization, 38 (2021), 1.
14. J. M. Berg, J. L.Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
15. https://www.britannica.com/science/amino-acid (Pristupljeno: 2.7.2022.)
16. X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H. J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, W. A. Scrivens, Journal of the American Chemical Society, 126(40) (2004), 12736–12737.
17. Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. A. S. Fernando, P. Pathak, S.-Y. Xie, Journal of the American Chemical Society, 128(24) (2006), 7756–7757.

18. S. Šafranko, D. Goman, A. Stanković, M. Medvidović-Kosanović, T. Moslavac, I. Jerković, S. Jokić, Chemosensors, 9(6) (2021), 138.
19. S. C. Ray, A. Saha, N. R. Jana, R. Sarkar, The Journal of Physical Chemistry C, 113(43) (2009), 18546–18551.
20. M. Liu, Y. Xu, F. Niu, J. J. Gooding, J. Liu, The Analyst, 141(9) (2016), 2657–2664.
21. Y. Liu, N. Xiao, N. Gong, H. Wang, X. Shi, W. Gu, L. Ye, Carbon, 68 (2014), 258–264.
22. Z. Lai, X. Guo, Z. Cheng, G. Ruan, F. Du, ChemistrySelect, 5 (2020) 1956–1960.
23. N. Mahato, M. Sinha, K. Sharma, R. Koteswararao, M. H. Cho, Foods, 8(11) (2019) 523.
24. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01167/full (Pristupljeno: 6.8.2022.)
25. O. V. Kharissova, B. Kharisov, All-carbon Composites and Hybrids, Royal Society of Chemistry, London, 2021.
26. Y.-Y. Yao, G. Gedda, W. M. Girma, C.-L- Yen, Y.-C. Ling, J.-Y. Chang, ACS Applied Materials & Interfaces, 9(16) (2017), 13887–13899.
27. https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=19971 (Pristupljeno: 27. 4. 2022.)
28. Y. Xu, D. Li, M. Liu, F. Niu, J. Liu, E. Wang, Sci. Rep., 7 (2017), 4499.
29. H. Xu, X. Yang, G. Li, C. Zhao, X. Liao, J. Agric. Food Chem., 63 (2015), 6707.
30. T. Chatzimitakos, A. Kasouni, L. Sygellou, A. Avgeropoulos, A. Troganis, C. Stalikas, Talanta, 175 (2017), 305.
31. H. Huang, J. Lv, D. Zhou, N. Bao, Y. Xu, A. Wang, J. Feng, RSC Adv., 3 (2013), 21691.
32. C. Cheng, M. Xing, Q. Wu, Mater. Sci. Eng., 99 (2019), 611.
33. A. Tadesse, M. Hagos, D. Ramadevi, K. Basavaiah, N. Belachew, ACS Omega, 5(8), (2020), 3889.
34. https://www.britannica.com/technology/scanning-tunneling-microscope (Pristupljeno: 28.4.2022.)
35. https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=17657 (Pristupljeno: 28.4.2022.)
36. E. Joseph, G. Singhvi, Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy, 4 (2019), 91–116.
37. D. Titus, J. J. E. Samuel, S. M. Roopan, S. M. (2019). Characterization and Applications of Nanoparticles, 14 (2019), 303–319.

38. J. D. Clogston, A. K. Patri, Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, 14 (2010), 63–70.
39. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-zeta-potential-Chilingar-et-al-2014_fig1_324594344 (Pristupljeno: 7.8.2022.)
40. https://www.irb.hr/Gospodarstvo/Usluge-i-ekspertize/Mikroskop-atomskih-sila-nanoskop (Pristupljeno: 8.8.2022.)
41. https://www.thermofisher.com/hr/en/home/materials-science/elemental-analysis.html (Pristupljeno: 8.8. 2022.)
42. M. A. Jhonsi, State of the Art in Nano-Bioimaging, IntechOpen, London, 2018.
43. S. T. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P. G. Luo, L. Cao, Y.-P. Sun,The Journal of Physical Chemistry C, 113(42), (2009) 18110–18114.
44. https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=62675 (Pristupljeno: 21.8.2022.)
45. J. Xia, Y. Kawamura, T. Suehiro, Y. Chen, K. Sato, Drug Discoveries & Therapeutics, 13(2), (2019),114–117.
46. S. Chai, L. Zhou, S. Pei, Z. Zhu, B. Chen, Micromachines, 12(9), (2021), 1116.
47. C. Zehiroglu, SB. Ozturk Sarikaya, J Food Sci Technol. 56(11) (2019) 4757-4774.
48. S. Rodríguez-Varillas, T. Fontanil, A. J. Obaya, A. Fernández-González, C. Murru, R. Badía-Laíño, Appl. Sci. 12 (2022) 773.
49. https://www.britannica.com/science/mercury-poisoning (Pristupljeno: 26.8.2022.)
50. https://encyclopedia.pub/entry/1365 (Pristupljeno: 24.8.2022.)
51. B. Manoj, A. M. Raj, G. T. Chirayil, Sci. Rep. 7 (2017), 18012.
52. S. Šafranko, A. Stanković, S. Hajra, H.-J. Kim, I. Strelec, M. Dutour-Sikirić, I. Weber, M. H. Bosnar, P. Grbčić, S. K. Pavelić, Pharmaceuticals, 14 (2021), 857.

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI	
Ime i prezime	**Monika Kovačević**
Datum rođenja	15.08.1998.
Adresa	Eugena Podubskog 66, 34310 Pleternica
E-mail adresa	monika097k@gmail.com
Državljanstvo	hrvatsko
RADNO ISKUSTVO	
04/11/2021 – 15/02/2022 Osijek	Rad u trgovini – Konzum Plus d.o.o.
06/07/2021 – 06/10/2021 Požega	Rad u proizvodnji i pakiranju – Zvečevo d.o.o.
24/12/2018 – 09/01/2019 Pleternica	Rad na klizalištu – Poduzetnički centar Pleternica d.o.o.
OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE	
10/2020 – 10/2022 Osijek	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Odjel za kemiju Sveučilište J.J. Strrossmayera u Osijeku Cara Hadrijana 8A , Osijek
10/2017 – 09/2020 Osijek	Preddiplomski sveučilišni studij kemije Odjel za kemiju Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku Cara Hadrijana 8A , Osijek
09/2013 – 06/2017 Požega	Katolička gimnazija s pravom javnosti u Požegi Ulica pape Ivana Pavla II. 6
09/2005 – 06/2013 Pleternica	Osnovna škola fra Kaje Adžića Pleternica Školska 2, Pleternica
JEZIČNE VJEŠTINE	
Materinski jezik	Hrvatski

Drugi jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
Engleski jezik	C1	C1	B2	B2	B2

RAČUNALNE VJEŠTINE	
	Vrlo dobro poznavanje rada u Microsoft Office programskom paketu. Dobro poznavanje rada u programu OriginLab.
KONFERENCIJE I SIMPOZIJI	
02/06/2022 – 03/06/2022 – Osijek	ISC GREEN 2022 - 2. međunarodna studentska GREEN konferencija Synthesis of Amino Acid-Functionalized Carbon Quantum Dots from Citrus clementina Peel: Investigating the Antiradical Activity and Selectivity of Metal Ion Detection - postersko priopćenje (autori: Monika Kovačević, Kristina Jandel, Silvija Šafranko, Anamarija Stanković, Stela Jokić)
02/06/2022 – 03/06/2022 – Osijek	ISC GREEN 2022 - 2. međunarodna studentska GREEN konferencija Ekonomija atoma u sintezi paracetamola - postersko priopćenje (autori: Monika Kovačević, Mia Samardžija, Dajana Gašo-Sokač)
25/09/2020 – Kopački rit	9. Simpozij KOPAČKI RIT JUČER, DANAS, SUTRA 2020 Fotokemijsko zagađenje u urbanom i ruralnom području grada Osijeka i Kopačkoga rita - usmeno priopćenje (autori: Andrijana Čevizović Sekulić, Monika Kovačević, Ana Plasajec, Doris Prokopec, Brunislav Matasović, Elvira Kovač-Andrić)
AKTIVNOSTI	
10/5/2021 – 15/5/2021	Festival znanosti - radionice
5/12/2019 – 6/12/2019	23. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - radionice
13/12/2019 – 14/12/2018	22. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - radionice