

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ЕЛЕКТРОТЕХНИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ненад К. Станковић

**МИКРОСКОПСКА, СПЕКТРОСКОПСКА И  
БИОМЕДИЦИНСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА  
ХИБРИДНИХ УГЉЕНИЧНИХ  
НАНОСТРУКТУРА**

Докторска дисертација

Београд, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF ELECTRICAL ENGINEERING

Nenad K. Stanković

**MICROSCOPIC, SPECTROSCOPIC AND  
BIOMEDICAL CHARACTERIZATION OF  
HYBRID CARBON NANOSTRUCTURES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

Ментори:

др Зоран Марковић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за Нуклеарне науке “Винча”

др Милан Тадић редовни професор, Универзитет у Београду, Електротехнички факултет

Чланови комисије:

др Јелена Радовановић, редовни професор, Универзитет у Београду, Електротехнички факултет

др Владимир Арсоски, ванредни професор, Универзитет у Београду, Електротехнички факултет

др Ненад Игњатовић, научни саветник, Институт техничких наука САНУ

др Биљана Тодоровић Марковић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за Нуклеарне науке “Винча”

др Милан Поњавић, редовни професор, Универзитет у Београду, Електротехнички факултет

Датум одбране:

# Микроскопска, спектроскопска и биомедицинска карактеризација хибридних угљеничних наноструктура

**Резиме:** Угљенични наноматеријали су током последњих неколико деценија постали предмет многобројних истраживања, због својих изузетних структурних, електронских, топлотних, оптичких и хемијских својстава. У тим истраживањима посебан акценат ставља се на проучавање антибактеријских потенцијала различитих хибридних угљеничних наноструктура.

Хибридне наноструктуре су по дефиницији структуре које се састоје од два материјала (компоненти) од којих су један или оба на нанометарском нивоу и где је један материјал обично неорганске, а други органске природе. Хибридне угљеничне наноструктуре су хибридне структуре у којима је један од материјала угљенични наноматеријал, као на пример фулерен, наноцеви, графен, графенске квантне тачке, итд.

Графен је моноатомски слој, тј. раванска или 2D структура која се састоји од атома угљеника међусобно повезаних  $sp^2$  хибридизованим везама правилно распоређених у шестоугаонике (саћаста структура). Електрохемијски екслолирани графен представља један слој графена са великим бројем кисеоничних функционалних група распоређених на површини и ивицама графенског слоја. Значајна својства овог материјала су да је електрично проводан, дефектан услед присуства различитих врста кисеоничних група по површини и да се лако диспергује у води. Приликом електрохемијске екслолијације могуће је произвести нови тип графенских структура под називом наномрежа, која у самој равни графена има шупљине нанометарских димензија. Таква структура се лако може функционализовати хидрофобним молекулима. Један од таквих хидрофобних молекула је куркумин.

У првом делу експерименталног истраживања графен је синтетисан електрохемијском екслолијацијом графитних електрода у присуству електролита на бази сулфатних соли. Куркумин/графен хибриди били су синтетисани мешањем куркумина и екслолираних графенских колоида и произведени техником размене.

Угљеничне квантне тачке су нова врста угљеничних наноматеријала облика диска са латералним димензијама до 10 nm. Могу се добити поступком термалне декомпозиције из лимунске киселине или сечењем графен оксида различитим поступцима. Графенске квантне тачке су подгрупа угљеничних и карактеришу се високим процентом  $sp^2$  веза. Њихово најважније својство је дисперзбилност у води, врло изражена фотолуминесценца, одлична фотокаталитичка својства, као и ниска цена синтезе. Пошто спадају у групу фотоактивних супстанци могу се користити и у фотодинамичкој терапији.

У другом експерименталном истраживању флуоресцентне хидрофобне угљеничне квантне тачке биле су синтетисане методом кондензације одоздо-нагоре. Оне су искоришћене за депоновање униформних и хомогених Лангмир-Блоџет танких слојева на различите подлоге. Квантне тачке које формирају слој су нанометарских димензија и њиховим доношењем на одговарајућу подлогу милиметарских димензија добија се хибридна угљенична наноструктура од изузетног значаја за примену у органској наноелектроници.



За истраживање физичких, хемијских и антибактеријских својстава у експерименталном делу рада, коришћене су различите технике карактеризације: микроскопија атомских сила (AFM), трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ), скенирајућа електронска микроскопија (SEM), енергодисперзивна спектроскопија х-зрацима (EDS), Раманова спектроскопија, инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), електронска парамагнетна резонанца (EPR), мерења зета потенцијала, фотолуминесцентна мерења (PL и UV-Vis), рендгенска фотоелектронска спектроскопија (XPS), као и различити антибактеријски тестови.

Резултати првог експерименталног истраживања су коришћењем AFM микроскопије показали да је максимална латерална димензија електрохемијски ексфолираног графена 20  $\mu\text{m}$ , а просечна дебљина 11 nm (иако је дебљина неколико десетина монослојева, у жаргону се и даље прича о графену). Рамановом анализом је утврђено да произведени графенски листићи имају доминантне  $sp^2$  везе, а XPS спектроскопијом је утврђено да однос C/O износи 6,1 (унутар ексфолираног графена). Сви тестирани узорци имали су израженију антибактеријску активност према *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) као грам-позитивним бактеријама, у поређењу са *Escherichia coli* (*E. coli*), као представнику грам-негативних бактерија. Куркумин/графен хибриди су се показали као потенцијални антибиотички агенси са врло малом цитотоксичном функцијом.

У другом експерименталном истраживању, утврђено је да танки слојеви хидрофобних угљеничних квантних тачки депонованих Лангмир-Блоџет поступком озрачени плавом светлошћу, генеришу синглетни кисеоник. Коришћењем TEM микроскопије, утврђено је да хидрофобне квантне тачке имају облик спљоштеног елипсоида чије су усредњене осе 5 и 1 nm, респективно. Анализом резултата XPS спектроскопије утврђено је да у угљеничним квантним тачкама доминирају  $sp^3$  везе. Електронском дифракцијом под малим углом (SAED) измерено је растојање између (100) равни. Добијена је вредност од 0,244 nm која је блиска параметру решетке графита од 0,2456 nm.

Антибактеријски тестови на четири различите врсте бактеријских сојева (*E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) и *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)) открили су повећану антибактеријску активност угљеничних квантних тачака након озрачивања плавом светлошћу. Истовремено, хидрофобне угљеничне квантне тачке нису показивале цитотоксични ефекат на ћелијску линију кожних ћелија (фибробласта) мишева. Ова својства, као и јефтина производња, указали су на потенцијално коришћење ових слојева као одличне антибактеријске превлаке за различите биомедицинске примене.

**Кључне речи:** графен, хибриди, угљеничне квантне тачке, микроскопија атомске силе, спектроскопија, фотолуминесценца, биоматеријали

**Научна област:** Техничке науке - Електротехника и рачунарство

**Ужа научна област:** Електротехнички материјали и технологије (угљенични наноматеријали)

**УДК број:**

# Microscopic, spectroscopic and biomedical characterization of hybrid carbon nanostructures

**Abstract:** Due to its exceptional structural, electronic, thermal, optical and chemical properties, carbon nanomaterials have been the subjects of numerous researches over the last few decades. In these researches, a special emphasis is placed on studying the antibacterial potentials of various hybrid carbon nanostructures. Hybrid nanostructures are, by definition, structures consisting of two materials (components) of which one or both are at the nanometer level and where one material is usually inorganic and the other is organic. Hybrid carbon nanostructures are hybrid structures in which one of the materials is a carbon nanomaterial, such as fullerene, nanotubes, graphene, graphene quantum dots, etc.

Graphene is a monoatomic layer, i.e. a planar or 2D structure consisting of carbon atoms interconnected by  $sp^2$  hybridized bonds regularly arranged in a six-core (honeycomb structure). The electrochemically exfoliated graphene represents one layer of graphene with a large number of oxygen functional groups arranged on the surface and edges of the graphene layer. The important features of this material are that it is easily dispersible in water, conductive and highly defective due to the presence of different types of oxygen groups on its surface. During electrochemical exfoliation it is possible to produce a new type of graphene structures with holes of nanometer dimensions at the plane of graphene called nano-mesh. Such a structure can be easily functionalized with hydrophobic molecules. One of such hydrophobic molecules is curcumin. In the first part of the experimental research, the graphene was synthesized by electrochemical exfoliation of graphite electrodes in the presence of sulphate-based electrolytes. Curcumin/graphene hybrids were synthesized by mixing curcumin and exfoliated graphene colloids and produced by a solvent exchange method.

Carbon quantum dots are a new type of carbon nanomaterial of the disc shape with lateral dimensions up to 10 nm. They can be obtained by the process of thermal decomposition of citric acid or cutting of graphene oxide by various methods. Graphene quantum dots are a subgroup of carbon quantum dots and they are characterized by a high percentage of  $sp^2$  bonds. Their most important feature is in water dispersibility, strong photoluminescence and excellent photocatalytic properties as well as low cost synthesis. Due to the fact that they belong to a group of photoactive substances, they can be used in photodynamic therapy.

In the second experimental study of fluorescence hydrophobic carbon quantum dots are synthesized by a bottom-up condensation method. They are used to deposit uniform and homogeneous Langmuir-Blodgett thin films on different substrates. The quantum dots forming the film are nanometer dimensions and their deposition to an appropriate substrate of millimeter dimensions produces a hybrid carbon nanostructure very important for use in organic nanoelectronics.

Various characterization techniques were used to investigate physical, chemical and antibacterial properties in the experimental work: microscopy using atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), electron paramagnetic resonance (EPR), zeta potential measurement, photoluminescent measurements (PL and UV-Vis), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), as well as various antibacterial tests.

The results of the first experimental study using AFM microscopy showed that the maximum lateral dimension of the electrochemically exfoliated graphene was 20  $\mu\text{m}$  and the average width was 11 nm (although the width was several tenths of carbon monolayers, in jargon we are still talking about graphene). Raman analysis has determined that the produced graphene sheets have dominant  $sp^2$  bonds, and XPS spectroscopy has found that the C/O ratio is 6.1 (within exfoliated graphene). All tested samples had more pronounced antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) as gram-positive bacteria, compared to *Escherichia coli* (*E. coli*), as a representative of gram-negative bacteria. Curcumin/graphene hybrids have proven to be extremely promising antibiotic agents with very small cytotoxic function.

In the second experimental study, it was found that when the hydrophobic carbon quantum dots of the thin Langmuir-Blodgett films are irradiated by blue light, they generate singlet oxygen. By using TEM microscopy, it has been found that hydrophobic quantum dots have the shape of an ellipsoid with average axes of 5 and 1 nm, respectively. By analyzing the results of XPS spectroscopy, it was found that in carbon quantum dots  $sp^3$  bonds are dominated. Using selected area electron diffraction (SAED) the distance between 100 planes was measured. The obtained value of 0.244 nm is close to the parameter of the graphite lattice of 0.2456 nm.

Antibacterial tests on four different types of bacterial strains (*E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)) revealed increased antibacterial activity under the blue light irradiation. At the same time, hydrophobic quantum dots did not show a cytotoxic effect on the cell line of fibroblasts of mice. These properties, as well as inexpensive production, have indicated the potential use of these films as excellent antibacterial coatings for various biomedical applications.

**Keywords:** graphene, hybrids, carbon quantum dots, atomic force microscopy, spectroscopy, photoluminescence, biomaterials

**Scientific field:** Technical sciences - Electrical engineering and Computing

**Field of research:** Electrical materials and technologies (carbon nanomaterials)

**UDK number:**

## Захвалница

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Институту за полимере Словачке академије наука у Братислави, Институту за квантну физику Словачке академије наука у Братислави, Центру за полимерне системе Универзитета Томаш Бата у Злину, Пољопривредном факултету Универзитета у Београду и Лабораторији за радијациону хемију и физику „Гама“ Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду.

Овом приликом желим да изразим велику захвалност менторима др Зорану Марковићу и др Милану Тадићу на вођењу ове дисертације, консултацијама и на сталној подршци током мог рада.

Посебно бих се захвалио др Зорану Марковићу и др Биљани Тодоровић-Марковић на увек занимљивим и прагматичним идејама, предлозима и дискусијама, а нарочито на помоћи приликом израде експерименталног дела дисертације и писању научних радова проистеклих из ових истраживања.

Свесрдну помоћ при извођењу експеримената пружили су и словачке колеге др Здено Шпиталски, др Петер Шифалович и Михал Бодик, студент докторских студија.

Такође желим да се захвалим и проф. Дејану Раковићу на правилном усмеравању и на веома корисним сугестијама током израде дисертације.

Хвала члановима комисије др Јелени Радовановић, др Владимиру Арсоском, др Ненаду Игњатовићу и др Милану Поњавићу, на стручној помоћи, запажањима, корисним саветима и прихватању моје дисертације.

Захваљујем се супрузи Александри и ћерки Мии за огромно разумевање и безграничну љубав. Њима и посвећујем овај рад, јер без њих би сваки мој труд био узалудан . . .

# Скраћенице

- 0D, 1D, 2D, 3D** - Нултодимензионални, једнодимензионални, дводимензионални, тродимензионални
- AFM** - Микроскопија атомских сила (енг. *atomic force microscopy*)
- CVD** - Хемијска депозиција из парне фазе (енг. *chemical vapor deposition*)
- DNK** - Дезоксирибонуклеинска киселина (енг. *deoxyribonucleic acid*)
- EDS** - Енергодисперзивна спектроскопија х-зрацима (енг. *energy-dispersive X-ray spectroscopy*)
- ЕНОРГ** - Електрохемијски екслофиланих високооријентисани пиролинички графит (енг. *electrochemically exfoliated HOPG*)
- EPR** - Електронска парамагнетна резонанца (енг. *electron paramagnetic resonance*)
- FDT** - Фотодинамичка терапија (енг. *photodynamic therapy*)
- FET** - Транзистори са ефектом поља (енг. *field effect transistor*)
- FTIR** - Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енг. *fourier transform infrared spectroscopy*)
- FWHM** - Полуширина максимума (енг. *full width at half maximum*)
- GQT** - Графенске квантне тачке (енг. *graphene quantum dots*)
- GO** - Графен оксид (енг. *graphene oxide*)
- hUQT** - Хидрофобне угљеничне квантне тачке (енг. *hydrophobic carbon quantum dots*)
- НОРГ** - Високооријентисани пиролинички графит (енг. *highly oriented pyrolytic graphite*)
- HRTEM** - Високорезолутни TEM (енг. *high resolution TEM*)
- LB** - Лангмир-Блоџет (енг. *Langmuir-Blodgett*)
- OD** - Оптичка густина (енг. *optical density*)
- PL** - Фотолуминесценца (енг. *photoluminescence*)
- PMMA** - Полиметилметакрилат
- RMS** - Просечна вредност хрпавости подлоге (енг. *roughness-root-mean square*)
- SEM** - Скенирајућа електронска микроскопија (енг. *scanning electron microscopy*)
- SAED** - Одабрана област електронске дифракције (енг. *selected area electron diffraction*)
- SPM** - Микроскопија скенирајућом сондом (енг. *scanning probe microscopy*)
- STM** - Скенирајућа тунелска микроскопија (енг. *scanning tunneling microscopy*)
- TEM** - Трансмисиона електронска микроскопија (енг. *transmission electron microscopy*)
- ТЕМР** - 2,2,6,6-Тетраметилпипиредин
- ТЕМРО** - 2,2,6,6-Тетраметилпипиредин-1-оксил
- UV-Vis** - Спектроскопија ултраљубичасте и видљиве светлости (енг. *ultraviolet-visible spectroscopy*)
- XPS** - Рендгенска фотоелектронска спектроскопија (XPS) (енг. *X-ray photoelectron spectroscopy*)

# Садржај

<b>1. Увод</b>	<b>1</b>
<b>2. Добијање, карактеризација и својства графена</b>	<b>2</b>
2.1. Алотропске модификације угљеника	2
2.2. Графен	3
2.3. Добијање графена	4
2.3.1. Микромеханичко цепање	4
2.3.2. Ексфолијација у течной фази	5
2.3.3. Редукција графен оксида	6
2.3.4. Таложење хемијских испарења	7
2.4. Карактеризација графена	9
2.5. Структура и својства графена	11
2.5.1. Електронска структура	11
2.5.2. Електрична својства	13
2.5.3. Оптичка својства	14
2.5.4. Механичка својства	16
<b>3. Примене графена, полимерних композита на бази графена и графенских квантних тачака у електротехници и биомедицини</b>	<b>17</b>
3.1. Примена графена у електроници	17
3.1.1. Транзистори са ефектом поља	17
3.1.2. Суперкондензатори	18
3.2. Примена полимерних композита на бази графена	19
3.2.1. Електронски уређаји	19
3.2.2. Складиштење енергије	19
3.2.3. Сензори	20
3.2.4. Електростатичко пражњење и заштита од електромагнетног зрачења	20
3.3. Примена графенских квантних тачака	20
3.4. Примена графена у биомедицини	21
3.4.1. Испорука лекова/гена и терапија канцера	21
3.4.1.1. Испорука лекова	21
3.4.1.2. Испорука гена	22
3.4.1.3. Терапија канцера	23
3.4.2. Биосензоринг и биоимицинг	24
3.4.2.1. Биосензоринг	24
3.4.2.2. Биоимицинг	24
3.5. Остале примене	25
3.5.1. Антибактеријски материјали базирани на графен оксиду	25
3.5.2. Графен оксид матрице за узгајање ћелија	26
3.5.3. Перспективе	27

<b>4. Методе за карактеризацију узорака</b>	<b>28</b>
4.1. Микроскопија атомских сила	28
4.2. Трансмисиона електронска микроскопија	32
4.3. Скенирајућа електронска микроскопија и енергодисперзивна спектроскопија х-зрацима	33
4.4. Раманова спектроскопија	35
4.5. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом	37
4.6. Електронска парамагнетна резонанца	38
4.7. Зета потенцијал	39
4.8. Фотолуминесценца	41
4.9. Ултраљубичаста и видљива апсорпциона спектроскопија	42
4.10. Рендгенска фотоелектронска спектроскопија	43
<b>5. Експериментални поступци</b>	<b>45</b>
5.1. Синтеза куркумин/графен хибрида	45
5.1.1. Ексфолијација графена	45
5.1.2. Екстракција куркумина	45
5.1.3. Припрема куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ колоида	45
5.2. Синтеза угљеничних квантних тачака	46
5.2.1. Припрема хидрофобних угљеничних квантних тачака	46
5.3. Коришћене методе за депоновање узорака	46
5.3.1. Депоновање методом спинкоатинга	46
5.3.2. Депоновање модификованом Лангмир-Блоцет техником	47
5.4. Карактеризација узорака	48
5.4.1. Снимање површинске морфологије узорака микроскопијом атомских сила	48
5.4.2. Снимање морфологије узорака помоћу трансмисионе електронске микроскопије	49
5.4.3. Снимање узорака скенирајућом електронском микроскопијом и хемијска карактеризација коришћењем енергодисперзивне спектроскопије х - зрацима	50
5.4.4. Раманова спектроскопија узорака куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ	51
5.4.5. Инфрацрвена спектроскопија узорака куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ	52
5.4.6. Анализе електронске парамагнетне резонанце hУКТ колоида	52
5.4.7. Мерење зета потенцијала узорака куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ	53
5.4.8. Фотолуминесцентна мерења hУКТ колоида и UV-Vis спектроскопија узорака	54
5.4.9. Рендгенска фотоелектронска спектроскопија hУКТ танких слојева	56
7.4.10. Антибактеријске активности	56
5.4.10.1. Утицај куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ колоида на раст ћелија праћен мерењем оптичке густине	57
5.4.10.2. Раст бактерија у присуству куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ колоида одређеног бројем бактерија одрживих у животу	57
5.4.10.3. Методологија за одређивање антибактеријске активности	58
5.4.10.4. Квантификација формирања биослоја и ефекат хидрофобних угљеничних квантних тачака на формиране биослојева	58
5.4.11. Цитотоксичност	59
5.4.12. Губитак материјала који апсорбује светлост на 260 nm	60
<b>6. Резултати и дискусија</b>	<b>62</b>
6.1. Куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ	62
6.1.1. Површинска морфологија узорака	62
6.1.2. Анализа резултата мерења зета потенцијала узорака	63

6.1.3. Анализа ултраљубичасте, видљиве и инфрацрвене спектроскопије узорака	64
6.1.4. Анализа раманове спектроскопије узорака	65
6.1.5. Анализа електронске парамагнетне резонантне спектроскопије узорака	67
6.1.6. Анализа антибактеријских активности	69
6.1.7. Морфологија бактеријских врста	71
6.1.8. Губитак материјала који апсорбује светлост на 260 nm	74
6.2. Лангмир-Блоџет танки слојеви хидрофобних угљеничних квантних тачака	75
<b>7. Закључак</b>	<b>84</b>
<b>8. Литература</b>	<b>86</b>
<b>9. Биографија аутора</b>	<b>103</b>
<b>10. Изјаве</b>	<b>105</b>



# 1. Увод

Угљенични наноматеријали, а нарочито графен, су уназад неколико деценија заокупљали пажњу многих научних тимова. У својим истраживањима они су доказали да графен има изузетна структурна, електронска, топлотна, оптичка и хемијска својства која га чине веома значајним за примену у многим областима. Графен се састоји од атома угљеника међусобно повезаних  $sp^2$  хибридизованим везама, правилно распоређеним у шестоугаонике [1]. Може се синтетисати различитим поступцима, а један од најчешћих је електрохемијска ексфолиација. Тако добијени графен представља једнослојни/вишеслојни графен са великим бројем кисеоничних функционалних група распоређених на површини и ивицама графенског слоја. Поред проводности и дефектности услед присуства различитих врста кисеоничних група по његовој површини, значајно својство овог материјала је и добра дисперзивност у води. Приликом поступка електрохемијске ексфолијације могуће је произвести нови тип графенских структура под називом наномрежа (nanomesh), која у самој равни графена има шупљине нанометарских димензија [1]. Таква структура се лако може функционализовати хидрофобним молекулима, као на пример куркумином, о чему ће бити више речи у поглављима 5, 6 и 7.

Угљеничне квантне тачке су нова врста угљеничних наноматеријала облика диска са латералним димензијама до 10 nm. Могу се добити на више начина, а један од њих је поступак термалне декомпозиције из лимунске киселине. Графенске квантне тачке су подгрупа угљеничних и карактеришу се високим процентом  $sp^2$  веза. Њихова најважнија својства су растворљивост у води, јака фотолуминесценца, одлична фотокаталитичност, као и ниска цена синтезе [2]. Ове квантне тачке такође имају веома важно својство да под одређеним условима могу молекуле неутралног кисеоника да преведу у молекуле синглетног кисеоника, који је изузетно хемијски реактиван молекул. То својство се користи за уништавање бактерија, о чему ће такође бити речи у даљем тексту ове дисертације.

**Циљ истраживања** био је испитивање различитих својстава нових типова хибридних угљеничних наноструктура коришћењем електрохемијски ексфолираног графена и угљеничних квантних тачака, и то: микроскопским, спектроскопским и биомедицинским методама. Електрохемијски ексфолиран графен оксид синтетисан је методом електрохемијске ексфолијације високо оријентисаног пиролитичког графита у раствору амонијум персулфата. Шупљине нанометарских димензија у структури добијене су подешавањем вредности интензитета струје и моларности електролита. Добијена графенска наномрежа функционализована је хидрофобним молекулом куркумина у алкохолном раствору. Електрохемијски ексфолиран графен/куркумин хибрид анализиран је применом AFM, SEM, XPS, Раманове спектроскопије, FTIR, мерењем зета потенцијала, UV-Vis фото-луминесцентне спектроскопије, EPR, и различитим антибактеријским тестовима и тестовима цитотоксичности.

Хидрофобне угљеничне квантне тачке синтетисане су методом пиролизе и трансфером из воденог раствора у хлороформу. Танки слојеви угљеничних квантних тачака депоновани су Лангмир-Блоџет поступком на силицијум диоксидне и стаклене подлоге. Процес формирања слоја детаљно је проучаван микроскопским и спектроскопским методама. Физичко-хемијска својства танких слојева хидрофобних угљеничних квантних тачака на стаклу и силицијум диоксиду испитиване су применом AFM, TEM, XPS, Раманове спектроскопије, FTIR, PL, UV-Vis и EPR спектроскопије. Биомедицинска својства слојева проучаване су на разним бактеријским сојевима применом различитих антибактеријских тестова, као и тестова цитотоксичности.

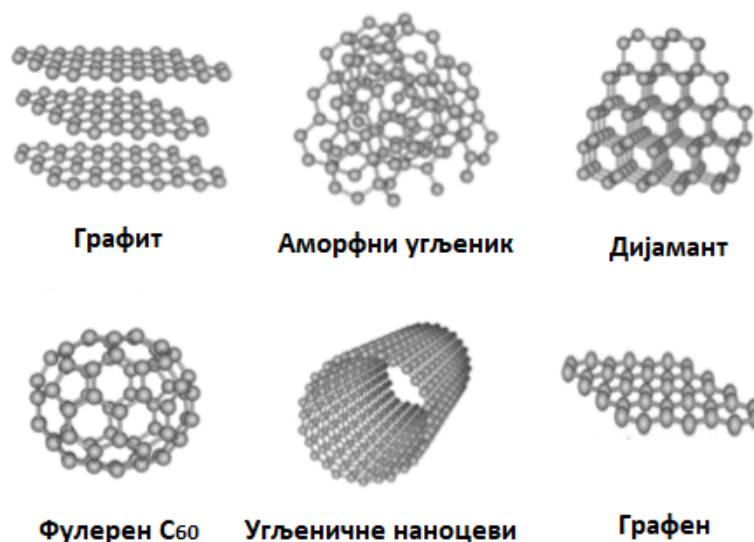
## 2. Добијање, карактеризација и својства графена

### 2.1. Алотропске модификације угљеника

Алотропска модификација неког хемијског елемента представља појаву да се тај елемент јавља у више хемијских облика различитих по броју атома у молекулу или се ти облици разликују у структурној формули молекула, тј. по самом начину везивања атома. Угљеник (С, атомски број 6 и релативна атомска маса 12,011) је хемијски елемент-неметал Iva групе периодног система елемената, који после водоника гради највећи број познатих једињења. Његове алотропске модификације се разликују по структури молекула и структури кристалне решетке. Постоје две основне алотропске модификације угљеника - дијамант и графит. Мрежа угљеникових атома са  $sp^3$  везом гради тетраедарску решетку која представља основну структуру дијаманта, док мрежа  $sp^2$  веза формира најчешћу и најстабилнију алотропску модификацију угљеника - графит (слика 2.1). Обе структуре имају изузетна и јединствена физичка својства као што су чврстоћа, топлотна проводност, итд. [1].

У претходних неколико деценија откривени су и многи други алотропи угљеника, међу којима су најпознатији фулерени ( $C_{60}$ ) са кристалном формом која спада у највећи ранг уређености, угљеничне наноцеви (CNT) у облику цилиндричне наноструктуре и графен који представља дводимензионалну структуру дебљине једног атома. Фулерене су 1985. године открили научници Kroto, Smalley, Heath, Curl и O'Brian на Универзитету Rice [3]. До открића су дошли проучавањем ласерског испаравања графита које је довело до формирања затворених кавеза састављених од угљеникових атома повезаних у пентагоналне и хексагоналне прстенове (слика 2.1). С обзиром на значај овог открића они су 1996. године награђени Нобеловом наградом за хемију [1]. Упоредо са истраживањем фулерена, јапански физичар Iijima је 1991. године открио угљеничне наноцеви (CNT), што је довело до новог подстрека истраживању угљеника, отварајући простор за његове даље примене [4]. Нарочито су наноцеви са једним зидом привукле доста пажње због једнодимензионалне (1D) цилиндричне наноструктуре, велике чистоће и симетричне конфигурације која има изузетна механичка и електронска својства [1].

Постоје и други алотропи угљеника као што су аморфни угљеник код кога је ренгентском анализом утврђена графитна структура (има примену у изради различитих врста филтера за пречишћавање воде), као и угљенична влакна са великом применом у грађевинарству. Ови алотропи који показују изузетна физичка својства у зависности од кристалне структуре и природе хемијске везе ипак нису довели до револуционарног помака у истраживању угљеника, као што је то био случај са открићем графена, првог стабилног дводимензионалног (2D) материјала. Током истраживања и у самој примени, графен је показао изузетна физичка, хемијска и електронска својства [1].



Слика 2.1. Шематски приказ алотропа угљеника који укључују графит, аморфни угљеник, дијамант, фулерен C<sub>60</sub> угљеничне наноцеви и графен (преузето и адаптирано са: <https://www.cheaptubes.com/screenshot-2018-08-22-at-6-50-12-pm/>).

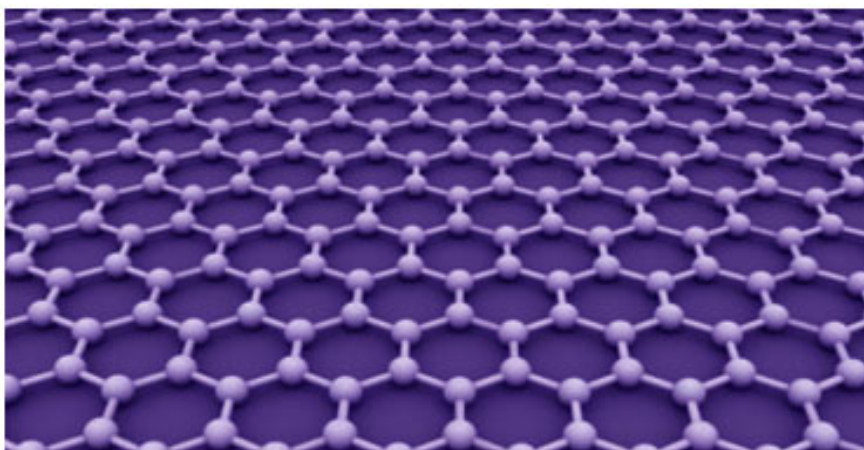
Хибридне наноструктуре су по дефиницији структуре које се састоје од два материјала тј. две компоненте, где је бар једна нанометарских димензија. Обично је једна од тих компонента неорганске, а друга органске природе. Хибридне угљеничне наноструктуре су хибридне структуре у којима је један од материјала угљенични наноматеријал, као на пример фулерен, наноцеви, графен, графенске квантне тачке, итд. Постоје два типа хибридних наноструктура: хибридна наноструктура састављена од танких слојева органског материјала нанометарске дебљине депонованих на неорганску подлогу и хибридна наноструктура као комплекс у којем су оба материјала нанометарских димензија.

У данашње време, нарочито у индустрији, постоји све већи број захтева за хибридним наноструктурама као што су: антистатички и антирефлексионни слојеви, слојеви отпорни на оштећења, слојеви против замагљивања стакала у возилима, антикорозиони слојеви на бродовима, фотодиоде, соларне ћелије, итд.

## 2.2. Графен

Графен је дводимензионални (2D) слој од  $sp^2$ -хибридизованог угљеника уређеног у кристалну решетку у облику „пчелињих саћа“ (слика 2.2). Као изузетан 2D систем графен је предмет вишедеценијског проучавања и предмет интересовања великог броја научника и истраживача. Веровало се да није термодинамички стабилан и да не постоји у слободном стању.

Најважнији експеримент у истраживању графена догодио се 2004. године, када су Geim и Novoselov са Универзитета у Манчестеру на веома једноставан начин први издвојили једнослојни графен поступком механичке ексфолијације високо оријентисаног пиролитичког графита (HOPG) [5]. Приликом издвајања су користили лепљиву траку (селотејп) и тако су по први пут добијени минијатурни листићи тог материјала. За своје откриће Geim и Novoselov су награђени Нобеловом наградом за физику 2010. године [1].



Слика 2.2. Шематска структура графена (преузето и адаптирано из реф. [1] и са: <https://gizmodo.com/5988977/9-incredible-uses-for-graphene>).

Коњугација је преклапање једне орбитале са другом у правцу  $\sigma$ -везе, где електрони не припадају вези или атому, већ групи атома. Код графена, створени облак електрона се лако транспортује под дејством електричног поља, тако да коњугација у овом материјалу доприноси његовим физичким својствима као што су: велика покретљивост електрона (теоријски  $200.000 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ) [6,7], теоријски велика специфична површина ( $2,630 \text{ m}^2/\text{g}$ ), велика топлотна проводност ( $\sim 5.000 \text{ W/m}\cdot\text{K}$ ) [8], Јангов модуо ( $\sim 1 \text{ TPa}$ ) [9], мала апсорпција упадне светлости ( $2,3\%$ ), тј. прозачност од  $97,7\%$  [1,10].

Имајући у виду изузетна својства графена (велика електрична проводност, хемијска и топлотна стабилност [11,12], одлична еластичност [13-15] и транспарентност), може се закључити да овај материјал има значајну предност у односу на остале материјале за израду органских електронских уређаја као што су соларне ћелије [11,13,15], органске светлеће диоде (OLED) [17,18], монитори осетљиви на додир [19], транзистори са ефектом поља (FET) [20,21], фотодетектори [22,23], итд. [1].

Иако научници и истраживачи још увек помно проучавају могућу примену графена у различитим областима, графен се због своје изузетне електричне проводности и велике специфичне површине већ показао као веома перспективан материјал за израду неметалних катализатора горивних ћелија [24,25], суперкондензатора [26,27] и литијум-јонских батерија [1,28,29].

## 2.3. Добијање графена

До сада је развијено више метода за добијање графена, а неке од њих које ће бити описане у овом поглављу су: микромеханичко цепање, ексфолијација у течной фази, редукција графен оксида (GO) и таложење хемијских испарења (CVD).

### 2.3.1. Микромеханичко цепање

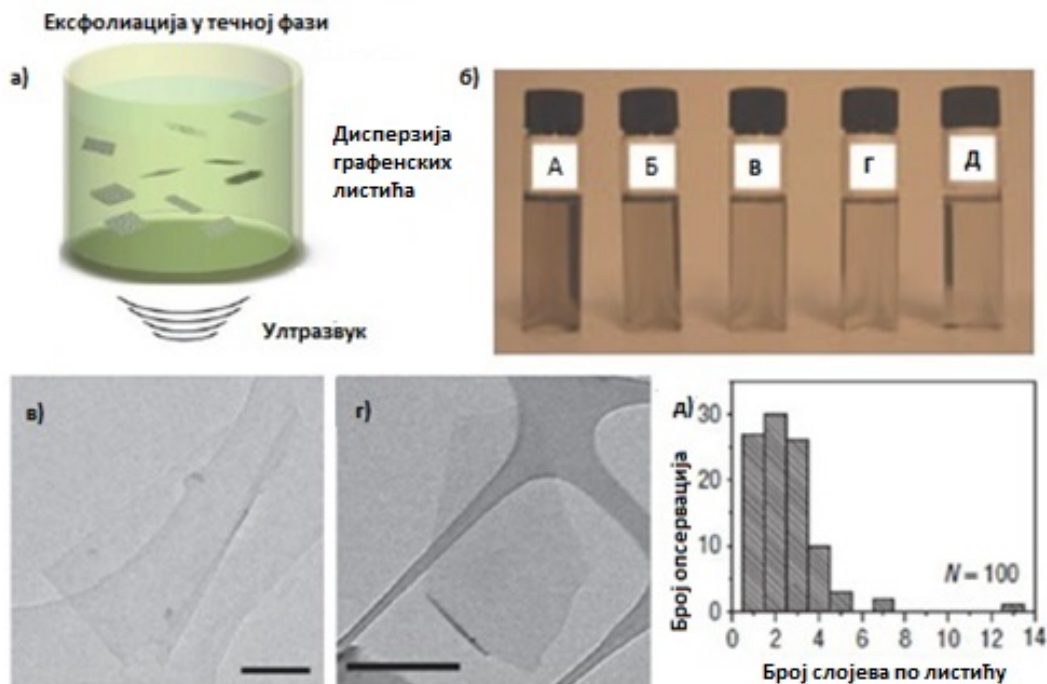
Микромеханичко цепање или метод „лепљиве траке“, подразумева узастопно одлепљивање тј. љуштење дела графита помоћу специјалне адхезивне траке [5], са које се затим механичким притиском графенски листићи преносе на одговарајућу подлогу. Чињеница је да овај метод поред своје једноставности и ниске цене још увек производи најбољи графен у смислу чистоће, дефеката, електронских и оптоелектронских својстава [30,31]. На жалост, овај метод је непрактичан за велики број примена и масовну производњу. Узрок томе је немогућност контроле броја слојева графена и постојање ограничених димензија, па се из тог разлога овај метод користи само за фундаментална истраживања [1].

### 2.3.2. Ексфолијација у течной фази

Графенски листићи могу се произвести поступком ултрасонификације природног графита коришћењем већег броја различитих органских растварача или јонских течности (соли у течном стању са тачком кључања испод  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (слика 2.3.а)) [32].

Ексфолијација графитних слојева се јавља због јаке интеракције графитне основне плоче и растварача. У овој методи растварач има значајну улогу при урањању чврстог тела у течност јер може смањити површински напон ( $\gamma$ ) између течности и графенских листића минимизирањем површина у контакту. Растварачи са површинским напоном од  $\sim 40\text{ mJ/m}^2$  као што су N-метил-пиролидон (NMP), N,N-диметилформамид (DMF),  $\gamma$ -бутиролактон (GBL) и други, показали су се као најбољи медијуми за ексфолијацију графита (слике 2.3.б,в)). Међутим, ако је концентрација при којој се графен раслојава повећана од  $\sim 0,01\text{ mg/ml}$  до  $1,2\text{ mg/ml}$  у NMP-у са ниском снагом сонификације, просечна величина листића се значајно смањује [1,32,33].

Због своје нетоксичности и ниске тачке кључања, вода би могла бити добар растварач. Међутим, ексфолијација графена у води се доста тешко изводи због великог површинског напона ( $\gamma \sim 72\text{ mJ/m}^2$ ) и некомпатибилности са хидрофобном природом листића графена, што се може делимично превазићи коришћењем анјонских сурфактаната [1,34,35,36,37].



Слика 2.3. а) Шематски приказ графена припремљеног помоћу ексфолијације у течной фази; б) дисперзија графенских листића у NMP-у у распону концентрације од  $6\text{ }\mu\text{g/ml}$  (А) до  $4\text{ }\mu\text{g/ml}$  (Д) након центрифугирања; в) и г) ТЕМ слике једнослојних графенских плочица депонованих из GBL и NMP респективно; д) хистограм више визуелних опсервација листића једнослојних и вишеслојних графена; (преузето и адаптирано из реф. [1,32,38]).

### 2.3.3. Редукција графен оксида

Графит оксид је први пут синтетисао професор Brody са Универзитета у Оксфорду 1859. године, континуалним третирањем графита са натријум хлоратом и азотном киселином [39]. У каснијим истраживањима обављеним 1958. године, Hummers и Offeman су пронашли ефикаснији метод за оксидацију графита помоћу мешавине натријум нитрата, калијум перманганата и сумпорне киселине [40]. Данас је постојећи једнослојни графит оксид широко познат као графен оксид (GO), док се појединачни слојеви GO могу посматрати као графен обогаћен кисеоником, тј. његовим функционалним групама (хидроксил, карбонил, епокси, итд.) [1,41-44].

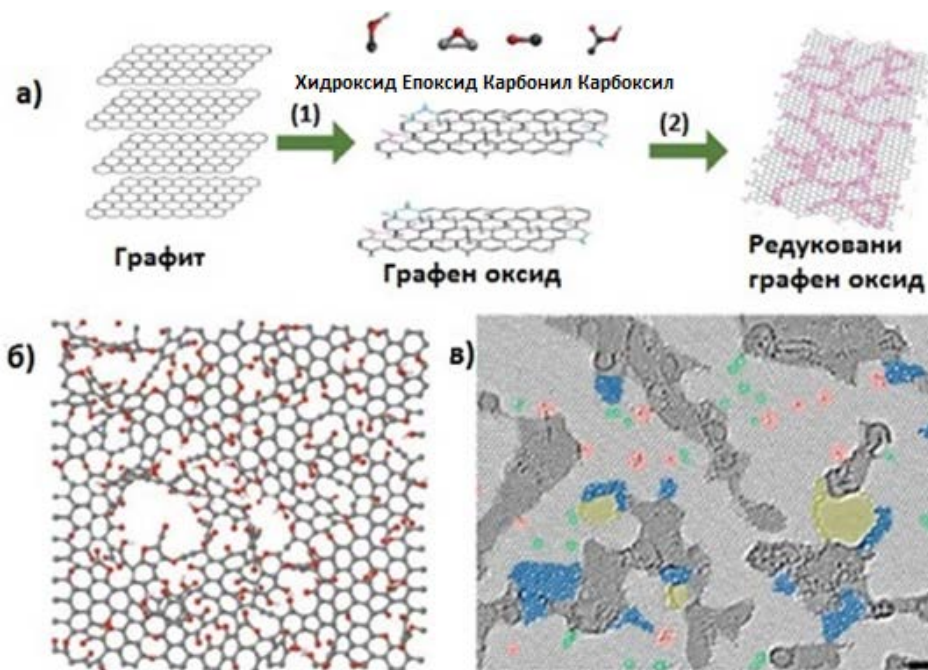
Кисеоник у GO највише се налази на основној равни у форми хидроксилних и епокси група, док су мање количине карбоксила, карбонила, лактона и кинона првенствено лоциране на ивицама листића [45]. GO је електрични изолатор и да би се вратила електронска својства графена, неопходна је хемијска или топлотна редукција GO, како би се уклониле функционалне групе кисеоника (слика 2.4.а)) [1].

Хемијска редукција GO листића се може окарактерисати као поступак „одозго-надоле“ и најчешће се изводи коришћењем хидразина ( $N_2H_4$ ) [46]. Тако редуковани GO (тј. rGO) постаје мање хидрофилан због делимичног уклањања кисеоника којег садрже функционалне групе [1].

Иако хемијска редукција GO представља једну од јефтинијих метода за производњу графена, на жалост, и она има своје мане као што су хемијска токсичност и превише дуго време потребно за завршетак процеса редукције (неколико сати до читавог дана). Осим тога, најчешће коришћени састојак за редукцију  $N_2H_4$  уводи азотне нечистоће у графен [47]. Са друге стране, показало се да је редукција GO у воденом раствору помоћу натријум борхидрида ( $NaBH_4$ ) много ефикаснија у односу на редукцију помоћу  $N_2H_4$  [48]. Такав процес редукције производи rGO са односом угљеника према кисеонику (C/O) од 13, у поређењу са 6,2 који се добија коришћењем  $N_2H_4$  [49]. Међутим, генерално лошија својства графена након редукције GO резултат су значајних оштећења  $sp^2$  угљеничне мреже. Овим оштећењем  $sp^3$  угљеници и ваканције (празна места) постају замке за електроне (слике 2.4.б,в)) [1,50].

Поред метода хемијске редукције, доказано је да топлотна редукција GO на високој температури (900 до 1100  $^{\circ}C$ ), нарочито у условима ултра високог вакуума (UHV), има велику ефикасност у производњи rGO са изванредним C/O односом ( $\sim 12,5$  до 14,1) [51,52]. Симулације базиране на теорији функционална густина (DFT) указале су да је веома тешко редуковати GO са C/O односом преко 16 [1,53].





Слика 2.4. а) *GO синтеза и редукција која укључује: (1) оксидацију графита до GO слојева где су листићи функционализоване епокси, хидрокси, карбонил групама и (2) конверзију GO у rGO кроз хемијски и/или термални третман; б) модел атома који шематски илуструје rGO основне равни која имају шупљине, тополошке дефекте и остатке група кисеоника; в) високо резолуциона трансмисиона електронска микрографија једнослојне rGO мембране. Шема у боји истиче различита структурна својства: тамно сива - загађени региони; плава - нарушене једнослојне угљеничне мреже или продужени тополошки дефекти; црвена - индивидуалне замене; зелена - изоловани тополошки дефекти; жута - шупљине и њихове ивичне конструкције. Размера: 1 nm (преузето и адаптирано из реф. [1,54,55]).*

### 2.3.4. Таложење хемијских испарења

Метода добијања графена помоћу таложења хемијских испарења (CVD) се заснива на физисорпцији (физичка сорпција Van der Waals-овим силама) и реакцији угљеничног прекурсора из парне фазе са површином подлоге. Први покушај синтезе једнослојног графена овом методом био је 1975. године коришћењем термалне декомпозиције угљоводоника на самој површини кристала платине (Pt) [56]. Међутим, услед недостатка карактеризације и скупе примене за такву врсту материјала тај процес није детаљније проучаван [1].

У литератури је раст графена CVD методом приказан за различите прелазне метале као што су Ru [57], Ir [58], Co [59], Pt [60], али тек добијени резултати раста на релативно јефтним поликристалним подлогама као што су Ni [61,62] и Cu [63,64], побудили су додатни интерес за примену ове методе [1].

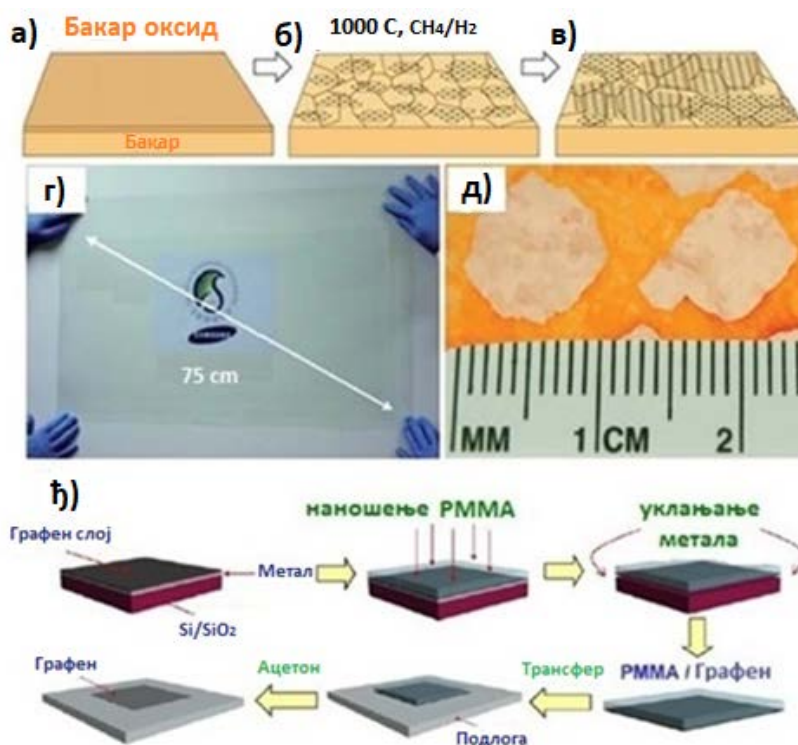
У првим истраживањима коришћена је Ni подлога. Међутим, уместо да се се један или неколико слојева графена формирају на целој површини подлоге, они су били формиран само на једном делу величине од неколико десетина  $\mu\text{m}^2$ , што је представљало велико ограничење за коришћење Ni подлога [1,65].

Применом поликристалних Cu фолија постигнут је униформни раст високо квалитетног једнослојног графена (SLG) преко веће површине подлоге (слике 2.5.а-в)). Више студија је потврдило ову чињеницу, а једна од њих је и студија Samsung Electronics-а која је показала раст SLG на правоугаоној површини са дијагоналном дужине од 75 cm и са 95% покривености подлоге (слика 2.5.г)) [19].

CVD раст графена на Cu се приписује термалној декомпозицији угљоводоника по површини подлоге, уз пратећу површинску дифузију атома угљеника услед његове ниске растворљивости у Cu ( $< 0,001 \text{ at\%}$ ). R. S. Rouff је објавио рад у коме је описао CVD производњу монокристала графена на Cu подлози величине 1 cm и покретљивости носиоца у опсегу од 15.000 до 30.000  $\text{cm}^2/\text{Vs}$  на собној температури (слика 2.5.д)) [1,66].

Полимерни раствори, као на пример поли(метилметакрилат) (PMMA) депонују се методом центрифугалног распршивања (енг. *spincoating*) на CVD-таложеном графену као подлози [67,68]. Након постављања PMMA/графена преко жељене подлоге, PMMA слој може бити растворен ацетоном (слика 2.5.ђ)). Међутим, потпуно уклањање PMMA слоја и даље остаје велики проблем [1,67,68].

Главни недостатак CVD раста графена су дуготрајни и понекад компликовани поступци потребни за пренос графена са металне површине на произвољну подлогу, висока цена поступка због коришћења велике количине енергије и доста велика температура одгревања.



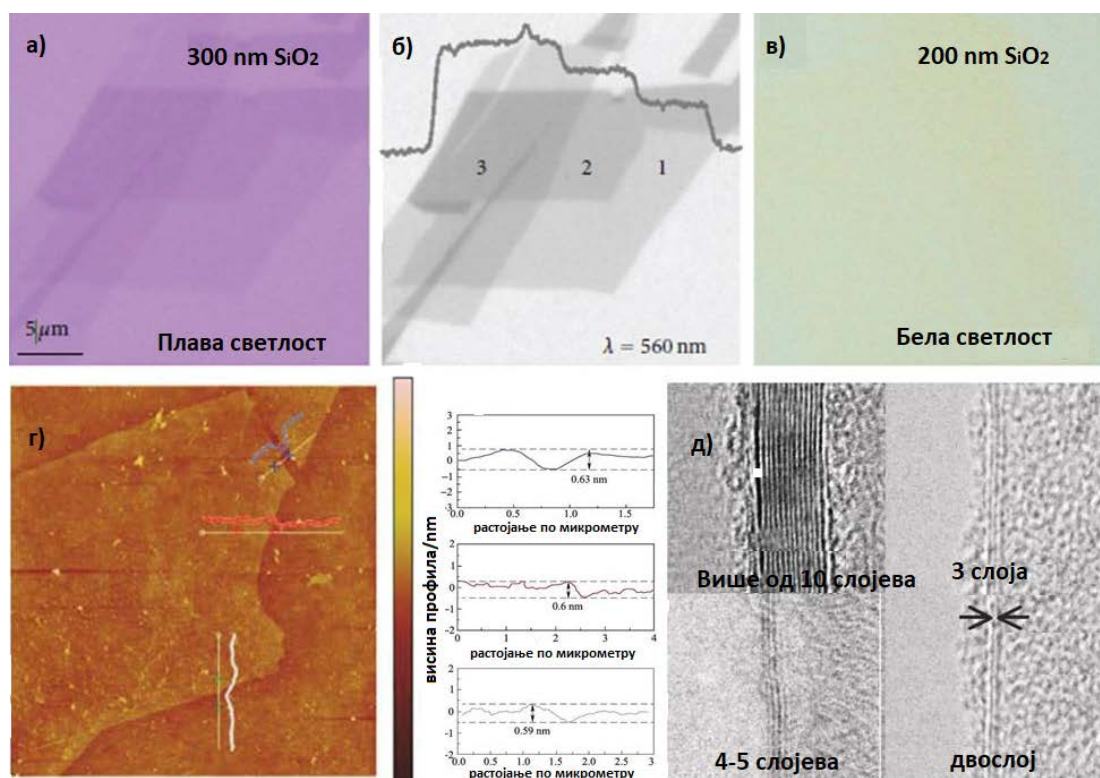
Слика 2.5. Шематске илустрације раста графена: а) излагање Cu фолије природној оксидацији, б) излагање Cu фолије атмосфери  $\text{CH}_4/\text{H}_2$  на  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$  са стварањем графенских острва, в) увећање графенских листића различитим оријентацијама решетке, г) Транспарентни графенски слој на 75 cm PET-у, д) Оптичка микроскопска слика центиметарске скале графена на Cu, е) CVD процес трансфера графена; (преузето и адаптирано из реф. [1,19,66,69,70]).



## 2.4. Карактеризација графена

Карактеризација графена се заснива на различитим микроскопским и спектроскопским методама, којима се идентификује графен, одређује број слојева графена, као и његова чистоћа у смислу дефеката, тежински и процентуални принос, итд. [1]. Једна од значајних карактеристика јесте принос хемијски екслоираног графена који може бити одређен помоћу различитих параметара, као што су тежински принос, принос у процентима, итд. Тежински принос је дефинисан као сразмера између тежине почетног графита и тежине екслоираног графитног материјала. Принос једнослојног графена (SLG) у процентима дефинисан је као однос броја SLG и укупног броја графитних листића у дисперзији, док је тежински принос SLG изражен односом између укупне масе распршеног SLG и укупне масе свих диспергованих листића [1].

Прве карактеризације тј. идентификације једног, дво- и тро-слојног графена биле су реализоване оптичком микроскопијом (ОМ), коришћењем контраста боја проузрокованим ефектом светлосне интерференције микромеханички екслоираног графена на  $\text{SiO}_2$  подлози, тј. разликом у бојама различитих слојева графена. Утврђено је да оптички контраст слојева зависи од дебљине  $\text{SiO}_2$ , коришћене таласне дужине и упадног угла светлости [71] (слике 2.6.а-в)). Ово својство графена је веома корисно за брзу детекцију слојевитости, тј. броја слојева графенских листића [1]. Дебљина графенских слојева може бити директно испитивана помоћу микроскопа атомских сила (AFM) [72], што је и приказано на слици 2.6.г). На основу висине „степеника“ графена на подлози, могуће је проценити број слојева графенских листића. Висина SLG одређена AFM-ом зависи од подлоге и влажности ваздуха, тако да је на  $\text{SiO}_2$  у распону од 0,6 до 1,0 nm, док је на лискуну 0,4 nm [73]. Са друге стране, дебљина једног слоја GO је апроксимативно 1,0-1,4 nm, што је због присуства функционалних група и апсорбованих молекула дебље него код (нефункционализованог) графена [1,41,74].



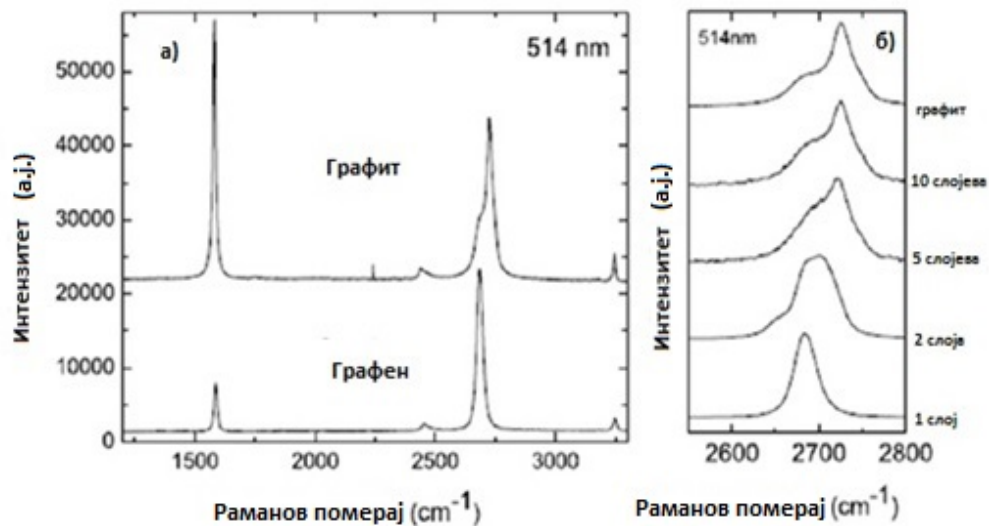
Слика 2.6. а),б),в) ОМ слике вишеслојног графена на  $\text{Si}/\text{SiO}_2$  која показује оптички контраст за различите таласне дужине, г) Слика графена на  $\text{SiO}_2$  подлози добијена помоћу AFM-а и профил по висини, д) TEM слика графена (преузето и адаптирано из реф. [1,71,72, 75]).

Коришћењем трансмисионог електронског микроскопа високе резолуције (HRTEM) могу се на основу електронске дифракције одредити кристална структура и морфолошка својства графена. Посматрањем ивица узорака може се одредити и тачан број слојева графена, где сваки слој одговара једној тамној линији (слика 2.6.д) [1].

Раманова спектроскопија представља метод којим се обезбеђује брз и ефикасан начин за структурну и квалитативну карактеризацију графена [32,76,77]. Главна својства Рамановог спектра за графите и графене су G трака на  $1580\text{ cm}^{-1}$  и 2D трака (која се још зове G' трака) на  $2700\text{ cm}^{-1}$ . Треће својство је D трака на  $1380\text{ cm}^{-1}$  која није рамански активна за нефункционализовани графен, али би могла бити узета у обзир тамо где је симетрија графена нарушена, као нпр. на ивицама графена [1].

D трака показује ниво дефеката у графену, па уколико она постоји у Рамановом спектру то значи да постоји одређени броја дефеката на слојевима графена. Тачкasti дефекти се класификују као ваканције, тј. празна места, или интерстицијски дефекти, тј. убацивање другог атома у решетку графена, а постоје и линијски дефекти или дислокације које обухватају велики број атома дуж линије у кристалу. G трака потиче од вибрација  $sp^2$  атома угљеника у равни и то је најистакнутије својство већине графитних материјала. 2D трака је двоструко резонантни Раманов процес који укључује расејање два фонона (тј. кванта топлотних вибрација кристалне решетке) са супротним моментима око тачке K високе симетрије у првој Брилуеновој зони графена [1].

Из резултата Раманове спектроскопије може се израчунати број слојева графена у графенском листићу [76] (слика 2.7), где повећање броја слојева доводи до значајног смањења релативне јачине интензитета 2D траке уз истовремено померање ка већем таласном броју, а вредност количника интензитета 2D и G трака ( $I_{2D}/I_G$ ) се постепено смањује. Количник интензитета D и G трака ( $I_D/I_G$ ) може бити коришћен за процену густине дефеката у узорку графена, тако да већи количник  $I_D/I_G$  указује на већи број дефеката у графену. Раманова спектроскопија може јасно разликовати једнослојни од двослојног или вишеслојног графена, али не више од пет слојева. [1,78].

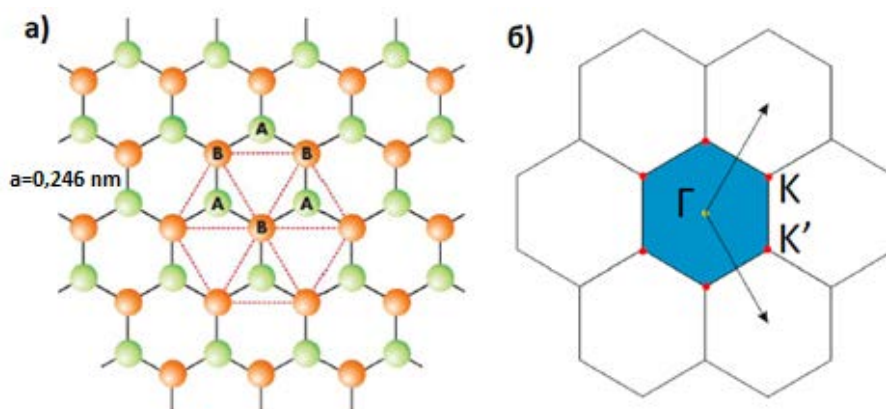


Слика 2.7. Поређење Рамановог спектра главног дела графита и графена на 514 nm; б) Развој 2D врхова на 514 nm за различити број слојева (преузето и адаптирано из реф. [1,78]).

За испитивање хемијског састава и идентификације присуства елемената у графену, а нарочито у GO и rGO, поред Раманове спектроскопије се често користи и рендгенска фотоелектронска спектроскопија (XPS). Израчунавање количника угљеник/кисеоник (C/O) се начелно користи за испитивање ефикасности редукције GO, а самим тим и за оцену квалитета добијеног графена. Велики C/O однос указује на малу количину функционалних група кисеоника повезаних са графенском равни, што значи да је посматрани узорак доброг квалитета [1].

## 2.5. Структура и својства графена

### 2.5.1. Електронска структура



Слика 2.8. а) Графенска решетка у реалном простору и б) решетка у реципрочном простору са високо симетричним тачкама  $\Gamma$ ,  $K$  и  $K'$  (преузето и адаптирано из реф. [79,80]).

Једна од значајних карактеристика чврстих тела је кристална структура. Она је одређена правилном структуром честица од којих је тело сачињено. Тела која се састоје од правилно распоређених атома или њихових група у тродимензионалном простору називамо кристалима. Просторна решетка кристала је скуп тачака дефинисаних вектором трансляције решетке, на основу које се може дефинисати категорија кристалног система. Елементарна (примитивна) ћелија је дефинисана као најмања просторна јединица кристала са свим његовим својствима, чијим правилним померањем у простору за удаљености које су једнаке њеним димензијама добијамо просторну решетку.

Кристална решетка графена спада у ред хексагоналних и садржи две подрешетке састављене од атома А (означен зеленом бојом) и В (означен наранџастом бојом) као што је приказано на слици 2.8.а). Свака од три  $sp^2$  орбитале атома угљеника ствара  $\sigma$  везу са три суседна атома угљеника чиме се формира хексагонална структура са основом од два атома А и В по елементарној ћелији. Атоми угљеника у оквиру решетке су повезани јаким ковалентним везама које су одговорне за стабилност решетке, као и за еластична својства графена. Растојање једноструке C-C и двоструке (C=C) ковалентне  $\sigma$  везе суседних атома угљеника је  $0,142 \text{ nm}$ , а параметар решетке  $a$  је  $0,246 \text{ nm}$  [79].

Слика 2.8.б) приказује решетку графена у реципрочном простору. Њена основна ћелија је позната као прва Брилуенова зона (енг. *Brillouin zone*) која је такође хексагонална (означено плавом бојом). Дуална представа таласног вектора  $k$  добијеног Фуријеовом трансформацијом кристалне структуре у реалном простору назива се реципрчни простор кристала. За физику графена значајне су тачке које се налазе у теменима ове зоне, а којих има укупно шест.

Међутим све ове тачке се не могу сврстати у Брилуенову зону из разлога међусобне еквиваленције. Центар Брилуенове зоне  $\Gamma$  је основна координата реципрочног простора где је  $\mathbf{k} = 0$ , а његови углови  $K$  и  $K'$  тачке. С обзиром да се ове тачке односе на два атома  $A$  и  $B$ , оне су из тог разлога нееквивалентне. Ротацијом од  $120^\circ$  могу се добити остали углови, што одговара симетрији кристалне решетке [79].

Електронска структура, која представља дозвољене енергије електронских стања у функцији од  $\mathbf{k}$ , може се израчунати помоћу простог модела чврсте везе. У апроксимацији најближих суседних атома угљеника добија се решење [79]:

$$E(\mathbf{k}) = \pm t\sqrt{3 + f(\mathbf{k})}, \quad (2.1)$$

где је  $t$  квантована енергија најближег суседа и  $f(\mathbf{k})$

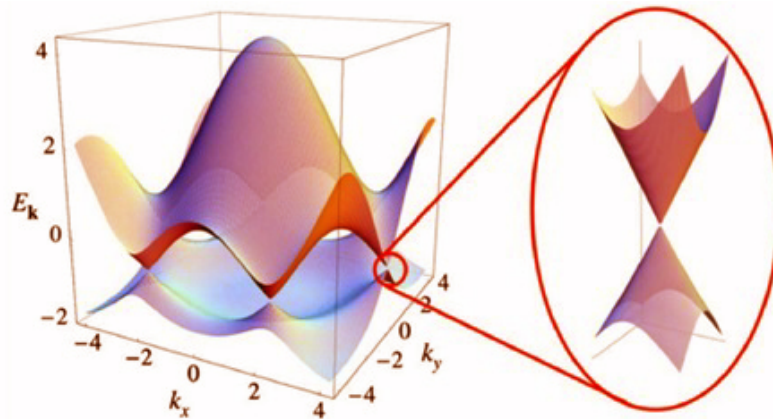
$$f(\mathbf{k}) = 2 \cos(\sqrt{3}k_y a) + 4 \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}k_y a\right) \cos\left(\frac{3}{2}k_x a\right). \quad (2.2)$$

На основу Блоховог модела (енг. *Bloch model*) зонска структура графена се састоји од две енергетске зоне - валентне и проводне. Ове две зоне су развојене енергетским процепом у читавој Брилуеновој зони, осим у шест тачака (слика 2.9) где се додирују. Ове тачке одговарају  $K$  и  $K'$  тачкама и још се називају Диракове тачке (енг. *Dirac spots*). У недопираном графену Фермијева енергија (енг. *Fermi energy*) лежи тачно у Дираковим тачкама и због тога се Фермијева површина састоји од шест тачака [79].

Једна од кључних својстава зонске структуре графена је линеарна зависност између нижих енергетских нивоа  $E(\mathbf{k})$  и електронских таласних вектора ( $\mathbf{k}$ ) близу Диракових конуса (слика 2.9) је [79]:

$$E = \pm v_F \sqrt{k_x^2 + k_y^2}, \quad (2.3)$$

где су  $k_x$  и  $k_y$  компоненте таласног вектора у смеровима  $x$  и  $y$  равни, а  $v_F \approx 10^6$  m/s Фермијева брзина.



Слика 2.9. Електронска зонска структура графена. Слика приказује Диракове конусе на  $K$  и  $K'$  угловима Брилуенове зоне (преузето и адаптирано из реф. [79,81]).

Посматрајући Диракове конусе на слици 2.9, закључујемо да се валентна и проводна зона додирују у тачки Дираковог пресецења енергије, тако да графен има нулти енергетски процеп, чиме оваква електронска структура указује на природу графена који је полуметал (семиметал) без енергетског процепа. Међутим, насупротив полуметалима, линеарна зависност између енергије и таласног вектора имплицира да је брзина електрона константна, тако да би носиоци наелектрисања у графену могли бити описани као релативистички фермиони без масе, где је брзина светлости замењена са  $v_F$  [81].

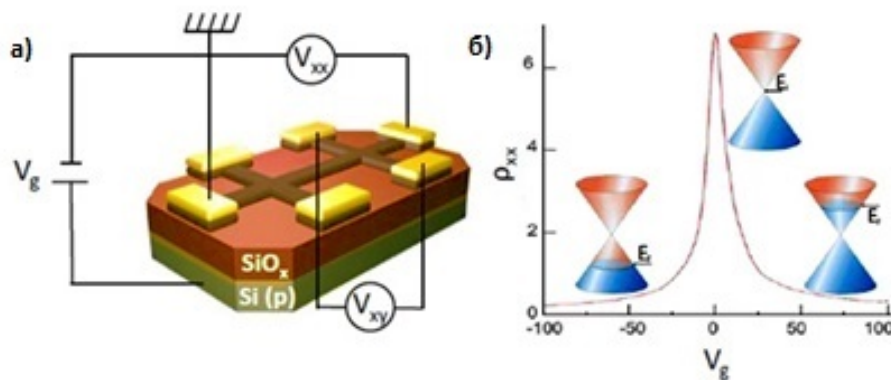


Према томе, уместо Шредингерове једначине (енг. *Schrödinger equation*) којом се обично описују електрони и шупљине у стандардним полупроводницима (силицијум и германијум), на носиоце наелектрисања у графену се примењује Диракова једначина [79].

## 2.5.2. Електрична својства

За проучавање електричних својстава графена морамо направити електронски уређај у који ће се интегрисати графенски листић (слика 2.10.а)). Као подлогу можемо користити Si покривен  $\text{SiO}_x$  слојем ( $\text{Si}/\text{SiO}_x$ ). На такву подлогу графенски листићи се експлодирају. Графен се обликује у Холову траку стандардне геометрије од око 1  $\mu\text{m}$  ширине са најмање четири електроде, док се двоструки слој контаката од 5 nm хрома (Cr) и 50 nm злата (Au) депонује помоћу електронске литографије. На слици 2.10 дат је шематски приказ шест електрода депонованих на  $\text{Si}/\text{SiO}_x$  подлогу. Макроскопски контакти од електрода до чипа се израђују мануелно коришћењем сребрне боје и златне жице [79].

Највећи део Si подлоге је р-допиран па је из тог разлога провадан, док слој оксида представља изолатор. Применом напона на листић графена и силицијумску подлогу (такозвани напон гејта  $V_g$ ) посматра се ефекат електричног поља у графену. Применом овог напона омогућено је подешавање густине носилаца у графену, а самим тим и контрола енергије Фермијевог нивоа [79].



Слика 2.10. а) Графенски уређај са 6 депонованих контаката на  $\text{Si}/\text{SiO}_x$  подлогу; б) Отпорност графенских листића зависно од напона гејта (преузето и адаптирано из реф. [30,79]).

Када се  $V_g$  примењује између гејта и узорка, Фермијева енергија графена може бити померена са своје недопиране позиције у Дираковој тачки, тј. повећати концентрацију наелектрисања у равни графена (слика 2.10.а)). Тачку где је Фермијева енергија једнака енергији Диракове тачке и где густина стања у графену ишчезава, називамо неутралном тачком. Као резултат тога, специфична отпорност у графенским листићима се значајно мења (нагло повећава) у околини тачке  $V_g=0$  (слика 2.10.б)). Постојање таквог оштрог пика у складу је са појавом смањивања концентрације носилаца наелектрисања при приближавању Фермијеве енергије Дираковој тачки. На тај начин се на основу позиције пика може одредити напон који одговара Дираковој тачки неутралности. Код различитих узорака, величина и позиција пика се незнатно мења, али се уочава исти ефекат [79,82].

Код обичног плочастог кондензатора са две електроде од графена, подлогом од р-допираног Si, и где је SiO<sub>x</sub> диелектрик, зависност концентрације носилаца наелектрисања  $n$  од напона гејта  $V_g$  се може израчунати формулом [79]:

$$n = \frac{\epsilon_r V_g}{ed}, \quad (2.4)$$

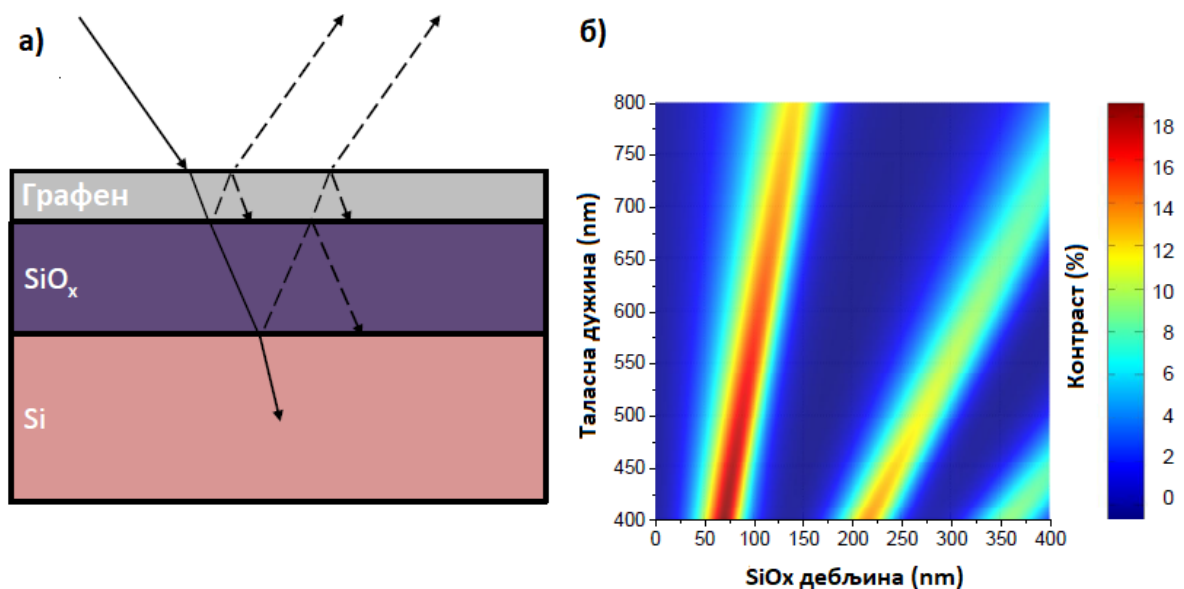
где је  $\epsilon_r$  релативна диелектрична пермитивност материјала у диелектричном простору (овде конкретно SiO<sub>x</sub>),  $d$  дебљина простора између електрода и  $e$  наелектисање електрона.

### 2.5.3. Оптичка својства

Графен дебљине једног атома (монослој) показује висок степен транспарентности, са апсорпцијом од приближно 2,3% беле светлости, што га узимајући у обзир и друга својства чини изузетним материјалом. Овај висок степен транспарентности се може објаснити последицом нискоенергетске електронске структуре графенског монослоја. Као резултат различитих истраживања закључено је да је до пет слојева графена апсорпција графенског танког слоја пропорционална броју слојева [10].

Такође, научници су утврдили да је апсорпција графена константна у целом видљивом спектру, да је посматрање графена помоћу оптичког микроскопа доста сложено и да се коришћењем различитих електронских филтера не може очекивати побољшање у контрасту графена на подлози. Међутим, уколико је подлога прекривена танким слојем оксида могуће је појачати контраст коришћењем ефекта интерференције [83]. Пажљивим одабиром дебљине и индекса рефракције подлоге и слоја оксида, могу се изазвати кохерентне промене у светлосној путањи, чиме се појачава контраст графена на подлози. Овај вишеструки међуповршински проблем приказан је на слици 2.11. а) [79,84].

За графен депонован на Si/SiO<sub>x</sub> подлогу, дијаграм на слици 2.11.б) даје теоријски приказ контраста, где се максимални контраст у зеленој области видљивог спектра (област на коју је људско око најосетљивије) између графена и Si/SiO<sub>x</sub> може добити коришћењем силицијум оксида дебљине око 90 nm (~18%) или 300 nm (~10%). Ово објашњава зашто је графен оптички видљив на Si/SiO<sub>x</sub> подлози, док је готово невидљив на другим подлогама као што су стакло и кварц [79].



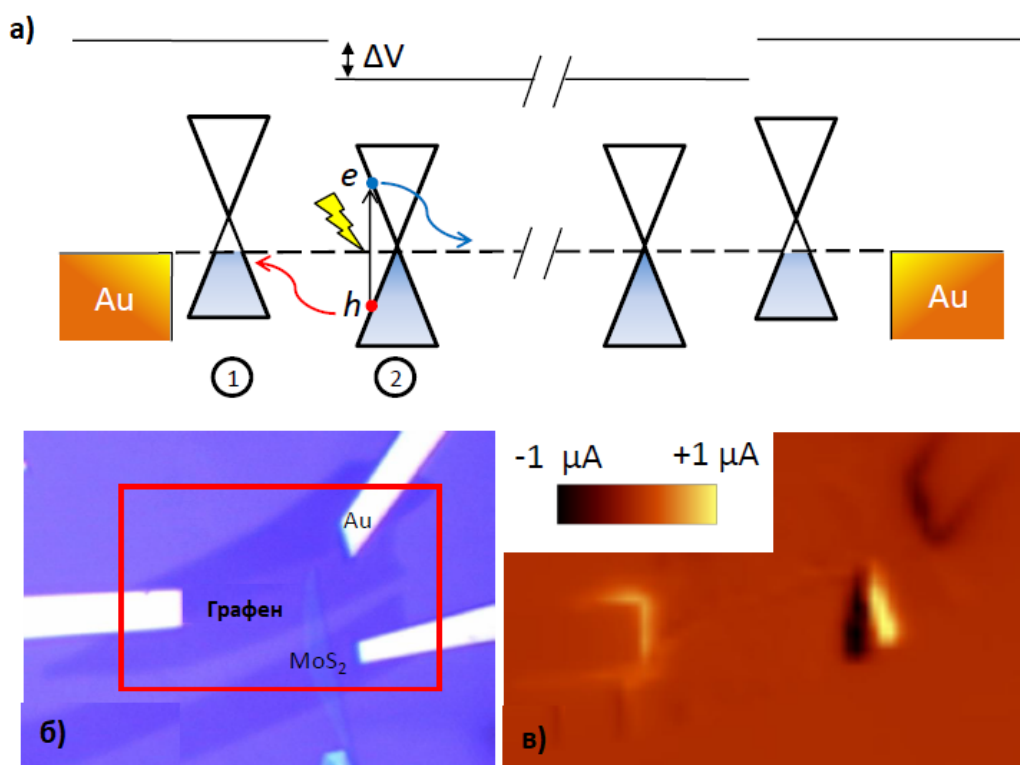
Слика 2.11. а) Трослојни проблем и б) резултирајући контраст израчунат за графенски листић депонован на Si/SiO<sub>x</sub> подлогу (преузето и адаптирано из реф. [79,84]).

Комбиновањем електронских и оптичких својстава графена направљени су такозвани графенски фотодетектори [85]. Показано је да они зависе од конверзије светлости у електричну струју. Фотоелектрични ефекат код ових уређаја се базира на механизму апсорпције фотона што је праћено настанком пара електрон/шупљина, што је описано вертикалном стрелицом на слици 2.12.а), или на механизму прикупљања носилаца наелектрисања побуђених светлошћу [79].

Код графена, фотони услед специфичне електронске зонске структуре могу бити апсорбовани са приближно једнаком ефикасношћу. Прикупљени електрони побуђени светлошћу, усмерени су због постојања електричног поља у материјалу, а њихово прикупљање мора трајати краће од типичног „времена живота“ пара електрон/шупљина. То значи да носиоци наелектрисања морају стићи до Au електрода пре него што дође до њихове рекомбинације. Код графенских фотодетектора преднапон се примењује између две електроде што ствара потенцијалну разлику у уређају, али због потрошње енергије овакво решење се не може увек користити.

На слици 2.12.а) је приказана појава скока потенцијала на контакту графен/злато, где је спој креиран графенским каналом различитог нивоа допираности зависно да ли је ближе или даље од контакта. Слика 2.12.б) је слика уређаја код кога је графенски листић спојен са једним слојем MoS<sub>2</sub>, депонованим насупрот њега. Мапирањем кретања наелектрисања која су генерисана након ласерског осветљавања откривају се подручја која се понашају као фотодетектори [79].

Услед супротних смерова р-п спојева на свакој од електрода, две области око контаката имају струје сличних величина али различитих поларитета - видети слику 2.12.а), што се такође може појавити у графен/MoS<sub>2</sub> хибриду - слика 2.12.в) [79,86].



Слика 2.12. а) Контактни ефекат на злато/графен површини. Пар електрон/шупљина је креиран после апсорпције фотона и касније раздвојен електричним пољем генерисаним на злато/графен споју. Диракова купа са ознаком (1) представља зонску структуру графена испод златне електроде или у њеној непосредној близини. Диракова купа са ознаком (2) представља зонску структуру основног графена даље од контакта. Због разлике у излазним радовима између графена и злата, Диракове купе (1) и (2) су померене једна од друге и креирају поље које је у стању да издваја носиоце наелектрисања побуђене светлошћу. б) Оптичка слика фотонапонског уређаја са графеном, MoS<sub>2</sub> и контактима од злата. в) пример фотострујне мапе добијене на таквој структури. Допирање може бити створено помоћу других материјала као што је MoS<sub>2</sub>. Механизам има слично порекло и фотоструја такође може бити генерисана на MoS<sub>2</sub>/графен споју (преузето и адаптирано из реф. [79,86]).

#### 2.5.4. Механичка својства

Поред осталих, графен има и изванредна механичка својства. Због јаке С-С ковалентне везе графен представља најчвршћи познати материјал [87]. Јангов модуо еластичности графена може бити измерен притиском АФМ врха на листић графена који лебди у ваздуху и наслања се својим крајевима на контакте (лебдећи графен) [79].

У таквом експерименту, мембрана је напрегнута до границе пуцања. У том тренутку и при таквим условима мери се сила и Јангов модуо еластичности. Даља мерења се обављају на приближно 1 ТПа [87], при чему се подужна сила пуцања процењује на 42 N/m у зависности од радијуса врха АФМ-а [88]. Различита истраживања су показала да је графен тврђи од дијаманта који има Јангов модуо приближно 900 GPa. Поред тога, графен се може еластично истезати до 20% и може бити лако савијен или склопљен [79,87,89].

Током механичких испитивања представљених у литератури, углавном су посматрани вишеслојни или једнослојни листићи графена произведени помоћу микромеханичке ексфолијације. Као резултат испитивања ломљивости и савитљивости графена, заједно са већ познатим изванредним електричним својствима, закључено је да је овај материјал идеалан за примену код електронских уређаја осетљивих на додир [19].

Такође, утврђено је да су мембране графена непропусне за све гасове [90], укључујући хелијум, а сам графен може бити коришћен и као гас детектор [91]. Експериментално је показано да при адсорбцији молекула гаса на слободној површини графена долази до промене отпорности [91] - слично као на слици 2.10. С обзиром на графенску дводимензионалну природу, цео материјал је у директном контакту са адсорбантима, чинећи тако материјал осетљивим за врло мале концентрације гаса. Способност отварања пора (шупљина) жељених димензија у графену ствара могућност коришћења графенских мембрана за раздвајање (сепарацију) гасова [92-94]. Најновија истраживања су показала да се графенске мембране могу користити и при утврђивање редоследа молекула DNK [79,95-97].



### **3. Примене графена, полимерних композита на бази графена и графенских квантних тачака у електротехници и у биомедицини**

С обзиром на велику електричну проводност, хемијску стабилност и механичку флексибилност, графен и његови деривати су предмет интензивног истраживања примене у различитим електронским и енергетским производима. Овде су истакнуте две важне категорије примене графена: једна примена се односи на коришћење графена као електроде или активне компоненте у електронским уређајима, док се друга примена графена или његових композита односи на израду електрода у енергетским уређајима за складиштење енергије (батерије) или њену конверзију (нпр. соларне ћелије).

Полимерни композити на бази графена у поређењу са чистим полимером [47,98-100] показују супериорне механичка, топлотна, електрична, гас баријерна и за пламен успоравајућа својства. Побољшања механичких и електричних својстава ових композита много су већа у поређењу са полимерним композитима пуњеним глином или угљеничним материјалима [47,101]. Иако угљеничне наноцеви (CNT) показују механичка својства упоредиве са графеном, графен је још увек у одређеним аспектима (топлотна и електрична проводност нпр.) бољи допант од угљеничних наноцеви [102].

Графенске квантне тачке (GKT) представљају нултодимензиони графенски флуоресцентни наноматеријал са пречником мањим од 100 nm. У овим наноматеријалима везе између атома угљеника имају  $sp^2$  хибридизацију. На површини и на ивицама GKT се налазе хидроксилне, епокси, карбонилне и карбоксилне функционалне групе, а услед ефекта квантног ограничења UV-Vis спектри показују зависност оптичке апсорпције од величине и начина синтезе GKT.

Њихова најзначајнија карактеристика је њихов полупроводни карактер представљен преко подесивог енергетског процепа, обично мањег од 1,5 eV. Из тог разлога, оне имају изванредна оптичка и електрична својства које их издвајају од осталих полупроводних квантних тачака.

#### **3.1. Примена графена у електроници**

У овом поглављу биће представљена примена графена у транзисторима са ефектом поља (FET) и суперкондензаторима.

##### **3.1.1. Транзистори са ефектом поља**

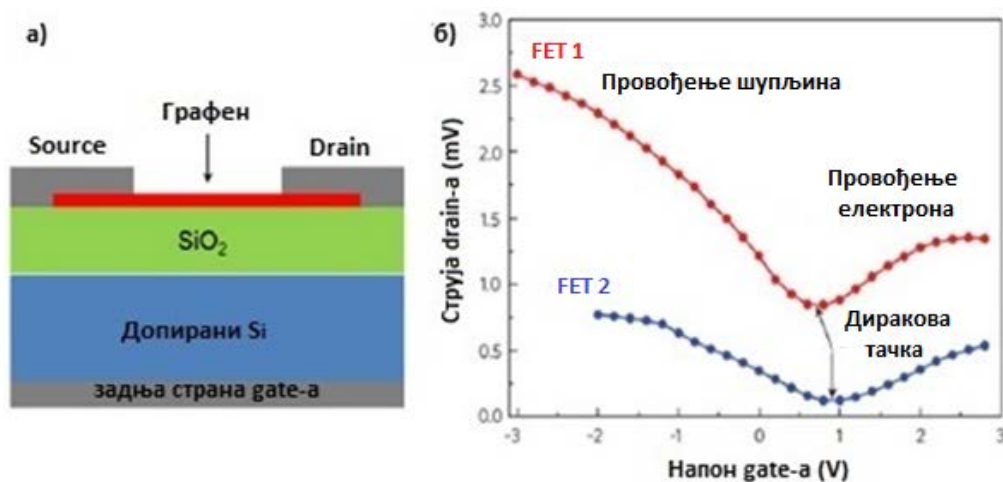
С обзиром на јединствену кристалну структуру, графен поседује изванредна својства преноса електрона и/или шупљина: ефекат амбиполарног поља, ултрависока покретљивост носилаца наелектрисања и проводност на собној температури. Ова својства не постоје у многим конвенционалним полупроводним материјалима као што су силицијум и германијум [1].

FET уређај базиран на графену се састоји од 300 nm  $SiO_2$  слоја испод графена, где  $SiO_2$  служи као изолатор на гејту са задње стране, а допирани силицијум као гејт (слика 3.1.а)) [7,103]. Велика површина графена у транзистору има јединствену струјно-напонску карактеристику (слика 3.1.б)).

Густина носилаца наелектрисања и тип носилаца (електрони или шупљине) у електродама транзистора се контролишу помоћу разлике потенцијала између изабране електроде и гејта.

У транзистору n-типа велики позитивни напон на гејту доводи до акумулације електрона, а у транзистору p-типа велики негативни напон на гејту доводи до акумулације шупљина. Такво понашање резултира двама гранама струјно-напонске карактеристике које су раздвојене Дираковом тачком (слика 3.1.б)) [104]. Позиција Диракове тачке зависи од неколико фактора: разлике излазних радова између гејта и графена, типа и густине носилаца наелектрисања на међуповршини и дну канала транзистора, као и степена допираности графена [1].

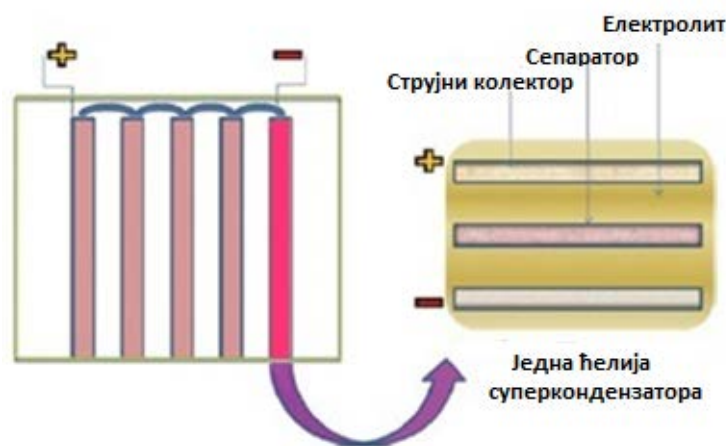
Поред коришћења графена као активног материјала у FET-овима, графен се такође користи за израду електрода source/drain (S/D). Због ниске вредности излазног рада, злато је најчешће коришћени материјал за израду S/D електроде код FET-ова од органских материјала (OFET). Међутим, упоређујући транзисторе који имају златне S/D електроде са транзисторима који имају графенске електроде, уочава се велика предност коришћења графена због ниске отпорности контаката, чиме се значајно унапређују целокупне перформансе OFET-а [1].



Слика 3.1. а) Шематски приказ графенског FET-а са гејтом депонованим са задње стране. Канал приказан црвеном бојом садржи или велику површину графена или графенске нанотраке; б) Типична преносна карактеристика за два FET-а са великом површином графенских канала (преузето и адаптирано из реф. [1,104]).

### 3.1.2. Суперкондензатори

Суперкондензатори су електрохемијски уређаји који се користе за брзо/реверзибилно складиштење и отпуштање енергије. Они се састоје од два колектора, две електроде, сепаратора и електролита. Ћелија суперкондензатора је у затвореном кућишту повезана као склоп колектор/електрода/сепаратор/електрода/колектор. Електролит се састоји од проводне течне мешавине воденог или органског раствора. Материјали базирани на графену су се због своје одличне проводности, велике специфичне површине, изузетне сопствене двослојне и велике теоријски срачунате капацитивности показали као најперспективнији материјали за израду електроде суперкондензатора [1,105,106].



Слика 3.2. Шематски приказ суперкондензатора (преузето и адаптирано из реф. [102]).

## 3.2. Примена полимерних композита на бази графена

Полимерни нанокмозити на бази графена могу се користити за израду различитих уређаја: *електронских* (органске соларне ћелије, уређаји са течним кристалом, органске светлеће диоде, уређаји за емитовање поља), *за складиштење (чување) енергије* (литијум-јонске батерије), *сензора* (рН, притисак, температура, биосензоринг), *за електростатичко пражњење (ESD)*, *за заштиту од електромагнетног зрачења (EMI)*, као и уређаја за *биомедицинске примене* (испурука лекова, гена, биоимицинг, терапија канцера, вештачки мишићи, итд.) [102].

### 3.2.1. Електронски уређаји

Имајући у виду својства као што су висока електрична проводност, велика покретљивост носиоца наелектрисања и умерено висока оптичка пропустљивост у видљивом делу спектра, полимерни композити на бази графена се могу користити као електроде за: уређаје са течним кристалом [11], органске соларне ћелије на бази органских боја [107-109], органске светлеће диоде, органске соларне ћелије [110-114] и уређаје за емитовање поља [102,115,116]. У соларним ћелијама, екранима осетљивим на додир, дисплејевима са равном плочом и другим електронским уређајима успешно се имплементирају проводни транспарентни слојеви на бази графена добијеним таложењем хемијских испарења или хемијском модификацијом (CMG). CVD графен се синтетизује на металној подлози, а онда се преноси на различите провидне слојеве као што су полидиметилсилоксан (PDMS) или полиетилен терефталат (PET) [19,110,116,117]. Овај приступ омогућава прављење слојева са мањом отпорношћу који имају велику примену код соларних ћелија [110], транзистора са ефектом поља [117] и уређајима осетљивим на додир [19,102].

### 3.2.2. Складиштење енергије

С обзиром на велики апсолутни потенцијал бољи него код стандардних водоничних ћелија (-3,04 V), малу атомску тежину ( $M = 6,94 \text{ g/mol}$ ) и велику густину енергије са теоријским вредностима до  $\sim 400 \text{ Wh/kg}$ , сматрало се да је литијум-јонска батерија једна од најперспективнијих решења уређаја за чување енергије [118,119]. Графен/CNT композити који се примењују у литијум-јонским батеријама се припремају мешањем раствора и таложењем хемијских испарења [102,120].

### 3.2.3. Сензори

Због ниског Џонсоновог шума, промене проводности као функције продужене површинске адсорпције и велике специфичне површине, графен се може применити за детекцију гасова [96,121,122] и биомолекула [123-125]. У међувремену, његова примена је проширена на израду рН сензора [126], као и на сензоре за притисак [127] и температуру [128]. У свом раду, Ваву је представио биосензор на бази GOD/злато/графен/нафион који је показао највећу осетљивост на ниво глукозе [102,129].

### 3.2.4. Електростатичко пражњење и заштита од електромагнетног зрачења

Нижи праг електричне проводности композита на бази графена у односу на чађ и нанопроводници настаје услед високе проводности и односа висина-латерална димензија графена, што даје предност коришћењу графена и проводних полимера (СП) у заштити од електростатичког пражњења и заштити од електромагнетног зрачења. Површинска отпорност у случају ESD материјала је распона између  $10^{12}$  до  $10^5 \Omega/\square$ , док је код EMI материјала нижа од  $10^5 \Omega/\square$ . Примене ESD и EMI материјала су вишеструке и то од материјала за тепихе до електронских склопова за телекомуникационе антене, делова за мобилне телефоне, фреквенцијски заштитних премаза за авионе, итд. [102].

## 3.3. Примена графенских квантних тачака

GKT имају веома јаку фотолуминесценцу у видљивом делу спектра и велику отпорност на појаву ишчезавања флуоресценце током екситације (енг. *photobleaching*). Тачан механизам фотолуминесценце није до краја истражен, али се претпоставља да потиче од емисионих трапова, екситације угљеника, кисеоничних функционалних група, ивичних дефеката, ароматичних структура и ефекта квантног конфинирања [130-133].

Велика покретљивост наелектрисања и подесива проводност чине их идеалним материјалима за израду електронских биосензора [134] и детекцију биоматеријала. Различити истраживачки тимови су доказали да се GKT могу користити и за биоимицинг, означавање делова ћелије канцера (ћелијска мембрана, цитоплазма и језгро), означавање матичних ћелија, преношење лекова, интеркалацију молекула DNK, побољшање перформанси органских фотонапонских уређаја, итд. У складу са новим истраживањима, показано је да гама зрачење има велике могућности за модификацију наноматеријала на бази угљеника. Промене које настају након гама зрачења углавном утичу на функционалне групе [135,136]. Гама зрачењем GKT жели се испитати могуће побољшање фотолуминесцентних карактеристика и сходно томе коришћење GKT за биоимицинг и фотодинамичку терапију (FDT).

За проучавање структурних, оптичких и нарочито фотолуминесцентних карактеристика користе се различите технике карактеризације. Група научника из Лабораторије за радијациону хемију и физику „Гама“ Института за нуклеарне науке „Винча“ у Београду је проучавала дејство гама зрачења на фотолуминесцентна својства GKT [137]. Експериментално је доказано да GKT изложене гама зрачењу достижу фотолуминесцентни квантни принос шест пута већи у односу на оне које нису биле изложене гама зрачењу.

Такође, примећено је и да је трајање фотолуминесценце било веће код гама озрачених GKT. Крајњи циљ тог истраживања био је испитивање способности неозрачених и озрачених GKT да делују као фотоосетљиве наночестице које производе синглетни кисеоник (фотосензитизери) [137].

Ефикасност GKT као фотосензитизера и средства за биоимицинг, истражена је праћењем стварања синглетног кисеоника у реалном времену. Главни резултат истраживања је показао да су GKT изложене мањим дозама гама зрачења бољи фотосензитизери у односу на оне које су биле изложене већим дозама [137].

Потврђено је да структурне промене изазване гама зрачењем имају директан утицај на способност GKT да произведу синглетни кисеоник и да су фотостабилније при продуженом UV осветљењу. Тако добијене GKT изложене мањим дозама гама зрачења представљају материјал који се потенцијално може користити за биоимицинг и FDT.

### **3.4. Примена графена у биомедицини**

Коришћење графена у биомедицини представља нову и веома перспективну област његове примене. Својства као што су биокомпатибилност и лака биолошко-хемијска функционализација квалификују графен за могућу успешну примену у преносу лекова и гена. Прва истраживања о коришћењу графена, тј. графен оксида (GO) у биомедицини обављена су 2008. године [138] и она су потврдила могућност ефикасног коришћења GO као наноносиоца за испоруку лекова. Последњих година интензивно се истражује коришћење графена у испоруци гена, изради биосензора, снимању биолошких објеката, изради антибактеријских и антиканцерогених материјала, као и изради биокомпатибилних матрица за узгајање ћелија [139]. Према доступним подацима може се рећи да су истраживања у овој области охрабрујућа, али још увек далеко од клиничке примене.

#### **3.4.1. Испорука лекова/гена и терапија канцера**

Најновија истраживања су показала да због велике равни  $sp^2$  хибризованог угљеника, велике специфичне површине ( $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ ) и на њој реактивних група као што су карбоксилна и хидроксилна, GO лако везује биомолекуле, што га чини идеалним наноносиоцем за ефикасну испоруку лекова и гена.

Велики број кисеоничних функционалних група чине да GO има одличну биокомпатибилност, физиолошку растворљивост, стабилност и способност да испоручи лекове или гене хемијском коњугацијом тј. везивањем гена за GO електростатичким силама или методом физисорпције [139]. Реактивне карбоксилне и хидроксилне групе GO олакшавају коњугацију са различитим системима као што су полимери [140], биомолекули [129], DNK [141], протеини [142-158], квантне тачке [145], наночестице  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [145] и друге, дајући GO мултифункционалност и мултимодалност за различите биолошко-медицинске примене. GO коришћен за испоруку лекова обично се састоји од 1-3 слоја (1-2 nm дебљине) и латералних димензија од неколико nm до неколико стотина nm [129,139,159,160].

##### **3.4.1.1. Испорука лекова**

Идеја о испоруци лекова на бази угљеничних наноцеви послужила је групи научника да дефинишу концепт и истраже могућност коришћења GO за испоруку водонерастворљивих антиканцерогених лекова у ћелије [138]. У таквом приступу GO је прво функционално спојен са полиетилен гликол (PEG) молекулима, а затим функционализован водонерастворљивим антиканцерогеним лековима коришћењем физисорпције ( $\pi$ - $\pi$  слагањем). Резултати експеримента су били изванредни јер се GO функционално спојен са PEG и напуњен са 10-хидрокси-7-етил-камптотецином (SN38) показао веома цитотоксичним за HCT-116 ћелије канцера дебелог црева [139].

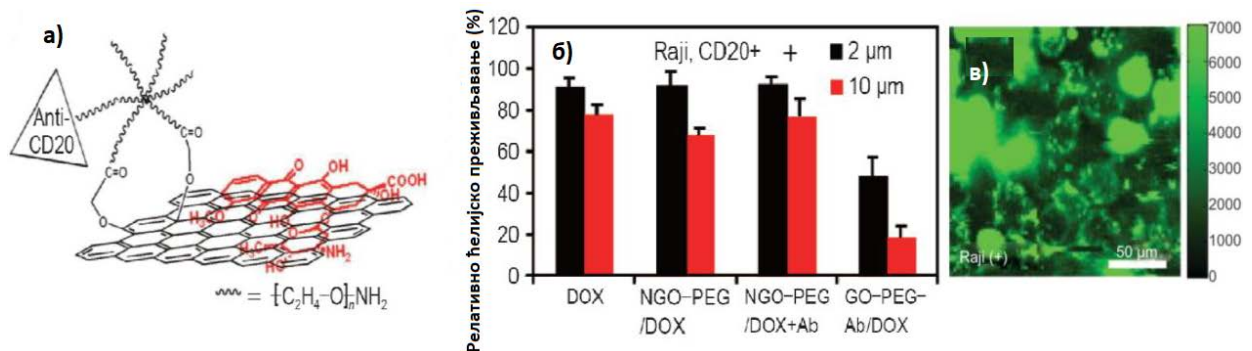
Друго истраживање се односило на циљану испоруку лекова коришћењем GO-PEG, коњугованим Ритуксаном ( $\text{CD}20^+$  антитета) [129] (слика 3.3). На основу експеримента и добијених резултата, откривена је зависност ослобођеног лека са површине GO од pH вредности чиме су отворене нове могућности за контролисано ослобађање лека [142-149,161].

Даљим истраживањем графена функционализованог поли-N-изопропилакриламидом откривена је и термички контролисана испорука лекова [139].

Многа клиничка испитивања и лечења оболелих од канцера, али других болести, показала су да након извесног времена ћелије канцера постају резистентне на примењене лекове. Из тог разлога се прибегава истовременом коришћењу више лекова, односно њиховој комбинацији [149-151]. Коришћење наноматеријала, између осталих графена и GO, за контролисану испоруку лекова је релативно нова метода у лечењу болести и може се рећи да је још увек у експерименталној фази.

У једном од истраживања, GO коњугован фолном киселином био је модификован са два лека - доксорубицином (DOX) и камптотецином (CPT). Спајање наноносиоца са лековима било је изведено преко контролисаног  $\pi$ - $\pi$  слагања графенске мреже са карбонским молекулима лекова. Експериментално је утврђено да овако комбинована испорука два лека, показује много већу цитотоксичност према MCF-7 ћелијама (ћелије рака дојке) него када је испорука обављена само са једним леком [138].

Даља истраживања испоруке лекова коришћењем GO проширена су и на лекове који се користе за третирање других болести, а не само канцера. Тако на пример у једном од експеримената, GO функционализован китосаном искоришћен је за испоруку антиинфламаторног лека ибупрофена [139,152].



Слика 3.3. а) Шематски приказ испоруке доксорубицина (DOX) у ћелије коришћењем GO-PEG који је коњугован Ритуксаном (CD20<sup>+</sup> антитела); б) Ин витро, у Петри шољи ван биолошког контекста, цитотоксичност за различите концентрације DOX-а која показује циљану испоруку у специфичне ћелије; в) Слика инфрацрвене флуоресценце ћелија третираних са GO-PEG који је коњугован Ритуксаном (CD20<sup>+</sup> антитела) (преузето и адаптирано из реф. [129,139]).

### 3.4.1.2. Испорука гена

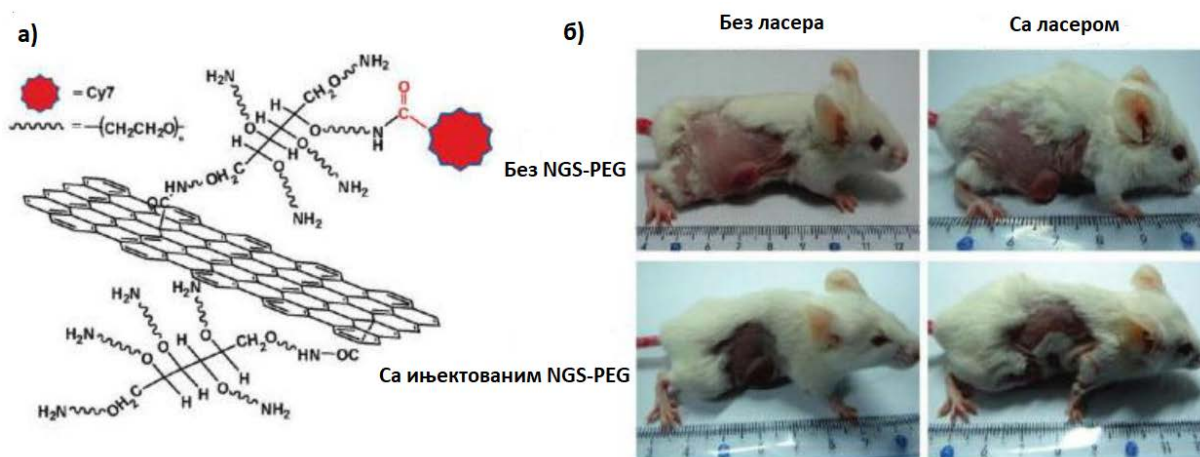
Генетска терапија представља нов и савремен приступ у лечењу или превенцији различитих болести које су проузроковане генетским поремећајима, као на пример цистичне фиброзе, Паркинсонова болест и канцер [154]. Сам поступак се заснива на увођењу новог типа гена у ћелије захваћене мутацијом. Да би генетска терапија била успешна потребно је да постоји генетски вектор за испоруку генетичког материјала у ћелије, који би штитио DNK од деградације нуклеаза и омогућио ефикасан пролаз DNK у ћелију [155].

Највећи изазов у развоју генетске терапије јесте недостатак ефикасног и безбедног генетског вектора [156]. Нека од успешних истраживања испорука гена коришћењем наноносилаца изведена су GO функционализованим полиетиленимином (GO-PEI) [157,158] и GO функционализованим китосаном (GO-CS) [139,162].



### 3.4.1.3. Терапија канцера

Да би се обавило клиничко лечење канцера, група научника је прво спровела *ин vivo* експериментално истраживање на мишевима. Први пут је у лабораторијским условима испитиван улазак функционализованог графен оксида GO-PEG у тумор, а затим и дејство фототермалне терапије. Резултати истраживања су показали велики степен улажења лека и то пре свега због врло ефикасног циљања тумора. Такође, због велике апсорпције GO већ при слабом ласерском озрачивању тумора у инфрацрвеној области (NIR), постигнуто је његово врло ефикасно уништење (слика 3.4) [139].



Слика 3.4. а) Шематски приказ графенског лстића (NGS) функционализованог PEG-ом и означеног помоћу Cy7; б) Фотографије тумора на мишевима након различитих третмана. Ласером озрачени тумор на мишу коме је убризган NGS био је у потпуности уништен (преузето и адаптирано из реф. [139,163]).

У даљим истраживањима вршено је упоређивање фототермалних активности графена и угљеничних наноцеви при инфрацрвеном зрачењу [164]. Упркос слабој апсорпцији, графенске наночестице функционализоване поливинилпиролидоном су показале већи пораст температуре у односу на наноцеви, што је довело до значајног оксидативног стреса тумора, деполаризације митохондрија и активације каспаза из којих је цурео цитохром C. Тиме је закључено да у датим условима графен боље убија туморске ћелије [139].

Ради спровођења *ин vitro* и *ин vivo* истраживања антиканцерогених својстава комбиновањем фототермалне и хемијске терапије, синтетизован је GO функционално спојен са политетилен гликолом и функционализован доксорубицином (GO-PEG-DOX). Експериментално је доказано да комбинована хемо-фототермална терапија испољава снажан синергистички ефекат који доприноси ефикаснијем убијању туморских ћелија у поређењу са одвојеном применом хемо и фототермалне терапије [139,165].

Такође, експериментално је показано да се GO коњугован фолном и сулфоничном киселином и функционализован порфиринским фотоосетљивим честицама, може користити за циљану фотодинамичку терапију [166]. FDT се због мале токсичности и велике стабилности у физиолошким условима, показала веома ефикасном у клиничком третирању различитих болести укључујући и канцер [167].

Експериментално је доказано да се GO може веома ефикасно функционализовати хлорин еб фотоосетљивом честицом и да такав систем повећава акумулацију фотоосетљивих честица у ћелијама тумора, доводећи до фотоефекта који зависи од њихове концентрације. Примена FDT у тавим условима резултира значајно побољшаним антиканцерогеним ефектом [139,168].

## 3.4.2. Биосензоринг и биоимицинг

### 3.4.2.1. Биосензоринг

Због својих изузетних хемијско-физичких и електричних својстава, као и способности лаке функционализације, графен и материјали на бази графена налазе примену и у биосензорингу. Нека новија истраживања су показала да се графен, GO, rGO [169] и допирани графен [170], могу користити за детекцију различитих биомолекула као што су тромбин [171], АТР [172], олигонуклеотид [173], аминокиселине [174] и допамин [175]. Са друге стране ови материјали као биосензори могу са великом селективношћу и осетљивошћу да детектују и велики број других компоненти чиме су се кандидовали за примену у дијагностици широког спектра болести. Помоћу њих се могу детектовати глукоза, хемоглобин, глутамат, холестерол, али и различити типови бактерија и вируса као што су *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, Зика вирус, HIV, Инфлуенца А вирус, итд. Последњих година направљено је неколико типова биосензора на бази GO, који користе врло ефикасно својство графена да неутралише флуоресценцу. Такође, направљени су и биосензори који користе резонантни енергетски фактор флуоресценце (FRET) [171,172], FET биосензори на бази електронских својстава графена [176], веома осетљиви биосензори за детекцију ДНК (нпр. нуклеотида) и осталих молекула [173,177-179], различити типови тумор маркера, итд. Најновија истраживања су показала да графен има значајан потенцијал за развој електрохемијских биосензора заснованих на директном преносу електрона између ензима и површине електроде [139].

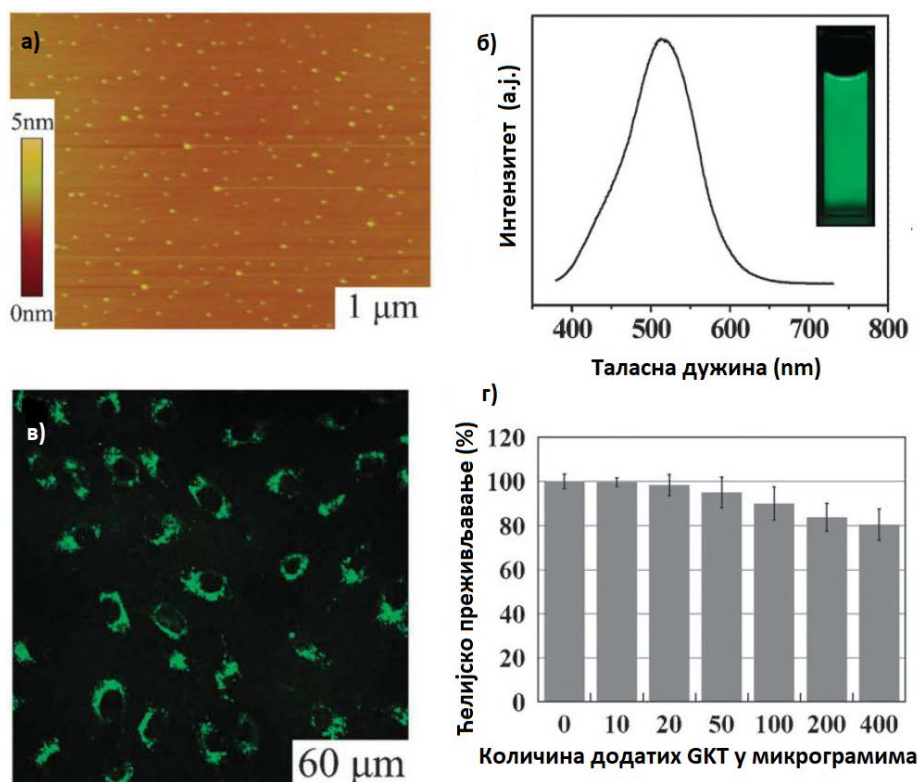
### 3.4.2.2. Биоимицинг

Биоимицинг је техника визуализације унутрашњости ћелија и ткива, тј. њихових физиолошких функција. Могућност примене GO у посматрању ћелијских појава коришћењем флуоресцентних молекула представља нову област истраживања. Група научника је у експерименталном раду открила да су GO честице величине до 10 nm, тзв. графенске квантне тачке добијене помоћу хемијске оксидације графита [180-182] или синтезом из молекула приступом одоздо-нагоре (енг. *bottom-up*) [183], показале сопствену флуоресценцу, чиме се стекао услов за њихово коришћење у биоимицингу [139]. У литератури су описане GKT са плавом емисијом, али су оне показале слабу флуоресценцу. Након краћег третмана паром хидразина добијена је знатно побољшана флуоресценца [180,181].

У другом експерименту, урађена је функционализација површине GKT помоћу алкиламина чиме је добијена побољшана флуоресценца [182]. Новије истраживање (слика 3.5) показало је да у поређењу са CdSe (кадмијум-селенид) и другим II-VI квантним тачкама, GKT имају одличну биокомпатибилност, физиолошку растворљивост и ниску цитотоксичност, тако да се могу директно користити за унутарћелијски имицинг [139,184,185]. Поред тога, GKT имају јединствене оптичке карактеристике као што је рН зависност и могућност „up-conversion“ (процес претварања енергије фотона са великим таласним дужинама у фотоне са мањим таласним дужинама), што уз постојећу способност флуоресценце омогућују да GKT буду побуђене у NIR области, чинећи био-детекцију и имицинг ефикасним, безбедним и без интерференце са сопственом флуоресценцом из ћелија, органа или ткива у тој области [138,186,187].

У широј клиничкој пракси као флуоресцентна имицинг техника користи се магнетно-резонантни имицинг (MRI) [188,189]. Истраживања и резултати синтезе композита састављеног од наночестица (NPs) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> обложеног декстраном и GO (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GO) као контраст-агенса за магнетну резонанцу [146], показали су да композит Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GO има добру физиолошку стабилност и ниску цитотоксичност, као и знатно већу магнетну резонанцу у поређењу са изолованим Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [139].





Слика 3.5. а) AFM слика GKT; б) Флуоресценца спектра разблаженог раствора GKT побуђеног на 375 nm и фотографија разблаженог раствора GKT под UV светлошћу (уметнуто); в) Ћелијски имџинг GKT сликан испод 405 nm; г) Цитотоксичност GKT (преузето и адаптирано из реф. [139,184]).

## 3.5. Остале примене

### 3.5.1. Антибактеријски материјали базирани на графен оксиду

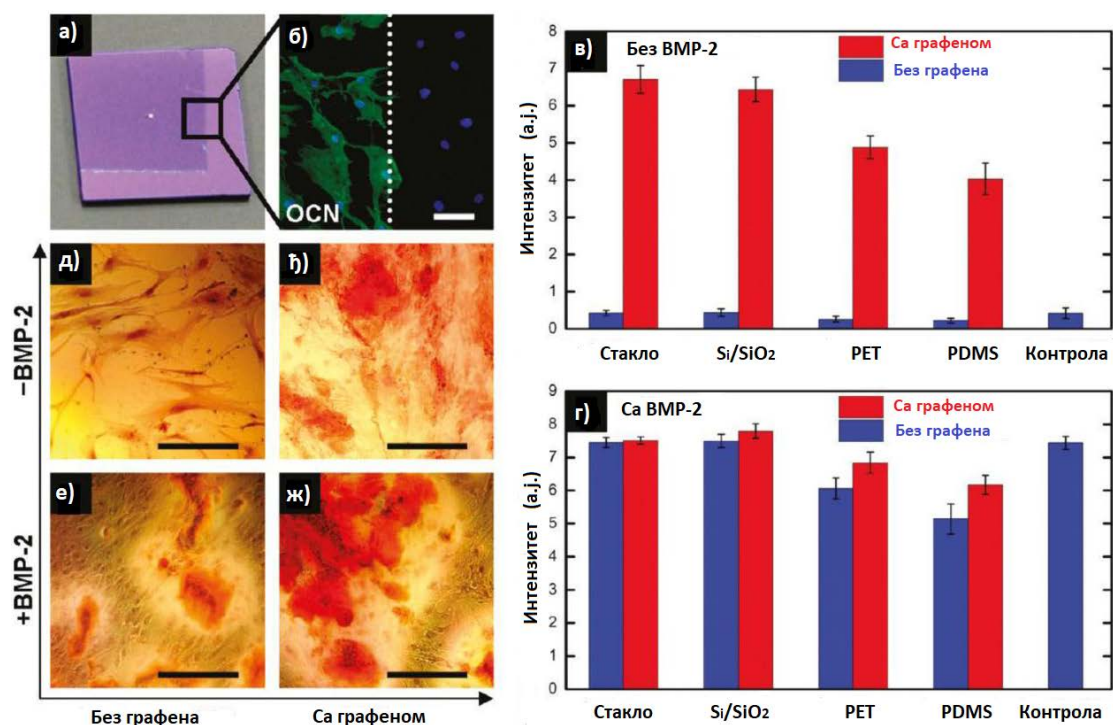
Резултати истраживања антибактеријског ефекта листића графена као нанозидова депонованих на нерђајући челик на коме су нанете грам-позитивне и грам-негативне бактерије [190], показали су да грам-негативне *E. coli* бактерије са спољном мембраном имају мања оштећења ћелијске мембране од грам-позитивних *S. aureus* бактерија које немају спољну мембрану [191]. Разумевање антибактеријског ефекта на мембрану бактерије и оксидативног стреса (производња токсичног кисеоника који оштећује мембрану бактерије), је веома значајно за разумевање интеракције између GO и бактерије, а самим тим и значајна информација за израду бољих антибактеријских материјала са посебном применом у медицини и заштити животне средине [139].

Показано је да су при контакту бактерије и графена, нанозидови rGO много токсичнији за бактерије од нанозидова GO, што је према резултатима истраживања проистекло из бољег преноса наелектрисања између бактерије и много оштријих ивица нанозидова rGO. Резултати даљих истраживања механизма антибактеријског ефекта четири типа производа на бази графена су показали да антибактеријске активности опадају по следећем редоследу: GO, rGO, графит (Gt) и графит оксид (GtO), из којих се може закључити да GO показује најбоље антибактеријска својства [139,190].

### 3.5.2. Графен оксид матрице за узгајање ћелија

Научници Ryu и Kim су истраживали понашања NIH-3T3 људских ћелија коже узгајане на слоју GO [139,192]. Резултати истраживања су показали да GO слој није оштетио ћелије приликом њиховог одвајања, чиме је указано на могућност примене GO као површине за облагање имплантата. У другом истраживању графен/китосан слој произведен методом сушења полимера коришћен је за израду матрица за узгајање ткива [193]. Резултати су показали да овај слој не омета пролиферацију (размножавање) хуманих матичних ћелија (hMSCs), већ убрзава њихову специфичну диференцијацију, тј. претварање матичних ћелија у остеобласте (коштане ћелије). То је сугерисало потенцијалну могућност пролиферације и трансплатације матичних ћелија и њихове специфичне диференцијације у мишићне, коштане и зглобне ћелије [194] (слика 3.6).

Друга студија је показала да је CVD графенска подлога биокompatibilна са хуманим остеобластима и матичним ћелијама које имају својство велике пролиферације. На основу резултата ове студије обављено је истраживање где је CVD графенска подлога коришћена као подлога за неурите, који представљају основну структуру за неуралне функције при развоју хипофизе мишева [195]. Резултати су указали да је средња вредност дужине неурита на слоју од графена значајно побољшана за време од 2 до 7 дана после засејавања, у поређењу са културом која је узгајана на полистиренским субстратима (TCPS), чиме је наговештена могућност примене основног графена као новог материјала за раст неурона [139].



Слика 3.6. Графенска подлога за остеогеничну диференцијацију. а) оптичка слика Si/SiO<sub>2</sub> чипа обичног графеном; б) Остеокалцин (OCN) маркер који приказује ћелијску формацију на истом чипу само на области на коју је депонован графен; в-з) Квантификација црвеног ализарина која потиче од hMSCs након 15 дана раста на субстрату са/без графена као и са/без BMP-2 (морфогенетички протеин костију који се налази висококонцентрисан у разним канцерима и који доприноси размножавању ћелија канцера); д-ж) PET субстрат обојен црвеним ализарином показује таложење калцијума услед остеогенезе (преузето и адаптирано из реф. [139,194]).

### 3.5.3. Перспективе

И поред несумњиво добрих резултата остварених у биомедицинској примени графена, још увек постоје проблеми које би научници требали да превазиђу. Један од таквих проблема је дубље разумевање интеракција графена и ћелија, а посебно механизам уношења хранљивих материја у ћелију. Такво додатно сазнање би довело до ефикасније испоруке лекова, а нарочито већу ефикасност биосензоринга, биоимицинга и других примена графена у биомедицини. Токсичност графена и GO такође представља проблем размотрен у свега неколико публикација [196-202]. Прелиминарни резултати истраживања су указали да физичко-хемијска својства (равна површина и наелектрисање) имају везе са појавом цитотоксичности графена и GO, као и да утичу на биодистрибуцију [203]. Уочени *ин витро* механизми биотоксичности објашњавају се оксидационим стресом и оштећењем ћелијске мембране, што ствара проблеме у практичној примени [139].

Тренутно истраживање испоруке лекова и гена у терапији канцера и других болести, се проширује на протеине, факторе раста, као и друге биомолекуле. Имајући у виду постојеће структурне карактеристике и изузетна физичко-хемијска својства, нови правац истраживања се усмерава на дизајн и конструкцију антиканцерогених и мултифункционалних платформи на бази GO. То захтева мултидисциплинарни приступ уз учешће научника из различитих области као што су хемија, биомедицина, наука о материјалима и нанотехнологија. Такође, да би GO за биомедицинске примене био супериорнији у односу на постојеће материјале, потребан је развој погодних хемијских синтеза и функционализације којима би се омогућила прецизна контрола величине наночестица графена, расподела те величине, морфологија и структура дефеката. За развој биосензора на бази GO, и даље постоје велики проблеми као што су контролисана модификација и подешавање електронских својстава, редукција и интеграција GO у уређаје са великом осетљивошћу, селективност са прихватљивом репродуцибилношћу, поузданост и цена [139].

Група научника је произвела нове антибактеријске агенсе на бази GKT. Након зрачења светлошћу GKT су синтетизовале реактивни кисеоник који је елиминисао два соја патогених бактерија (*S. aureus* и *E. coli*) отпорних на метицилин. Експерименти су урађени на мишевима и веома је значајно напоменути да су при истим експерименталним условима ћелије слезина код мишева остале неоштећене чиме се показало селективно фотодинамичко деловање GKT [204]. Даља истраживања би требало да буду усмерена на припрему GKT са добром контролом/функционализацијом величине и расподеле површинских дефеката [139].

Истраживања на графенским матрицама за узгајање ћелијских култура су релативно нова и радови из ове области су до сада показали да графен и GO убрзавају раст, диференцијацију и пролиферацију матичних ћелија. Ти резултати могу знатно побољшати инжењеринг ткива, регенеративну медицину и остала поља биомедицине [139].

## 4. Методе за карактеризацију узорака

Ово поглавље описује различите методе које су коришћене за карактеризацију хибридних угљеничних наноструктура. Да би се добили што прецизнији и валиднији резултати коришћене су следеће технике: микроскопија помоћу микроскопа атомских сила (AFM), трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ), скенирајућа електронска микроскопија (SEM) и енергодисперзивна спектроскопија x-зрацима (EDS), Раманова спектроскопија, инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), електронска парамагнетна резонанца (EPR), мерење зета потенцијала, фотолуминесцентна мерења (PL и UV-Vis) и рендгенска фотоелектронска спектроскопија (XPS).

Микроскопске технике су коришћене за испитивање и одређивање физичких својстава (облик, величина, итд.), док су спектроскопске технике коришћене за испитивање структуре и састава узорака (материјала). За мерење и одређивање утицаја светлосног зрачења рађена су фотолуминесцентна мерења.

### 4.1. Микроскопија атомских сила

Микроскопија скенирајућом сондом (енг. *scanning probe microscopy* - SPM) је грана микроскопије која даје слике површина користећи сонду за скенирање узорака. Принцип рада се заснива на мерењу међумолекулских интеракција које се јављају између молекула врха сонде и молекула површине испитиваног материјала. Најзначајније SPM технике су скенирајућа тунелска микроскопија (енг. *scanning tunneling microscopy* - STM) и микроскопија атомских сила (енг. *atomic force microscopy* - AFM).

STM микроскоп су 1981. године конструисали Binnig и Rohrer, и за то добили Нобелову награду. Међутим, основно ограничење у раду са STM-ом било је немогућност испитивања електрично непроводних материјала. Да би се овај проблем превизишао развијен је микроскоп атомских сила - AFM.

Метод су открили и сам уређај конструисали Binnig, Quate и Gerber 1986. године, у оквиру истраживања компаније IBM у лабораторијама у Цириху [205].

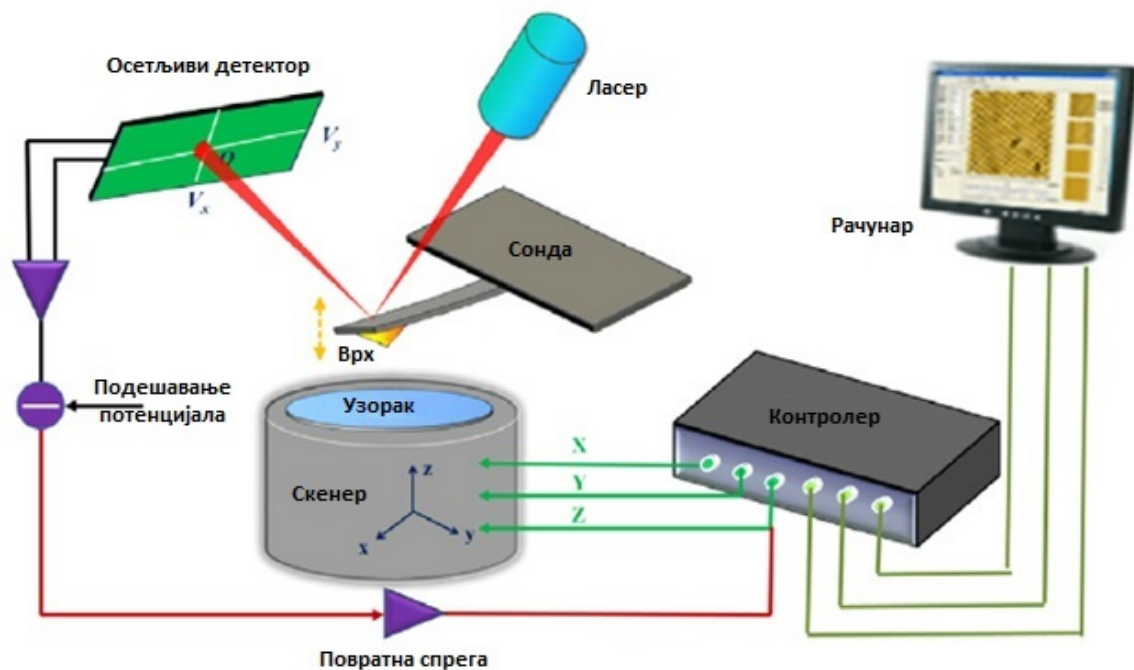
На слици 4.1 приказане су главне компоненте AFM-а [206]:

1. Платформа на коју се ставља узорак, AFM скенер, оптички микроскоп и контролни систем за померање скенера по x, y, z осама у односу на узорак [205]. Помоћу сонде се обавља скенирање узорка [207].

2. Управљачка електроника која генерише електронске сигнале потребне за померање компонента платформе, као на пример Z мотор и XYZ скенер и помоћу које се слике са платформе претварају у дигитални сигнал ради приказивања на рачунару.

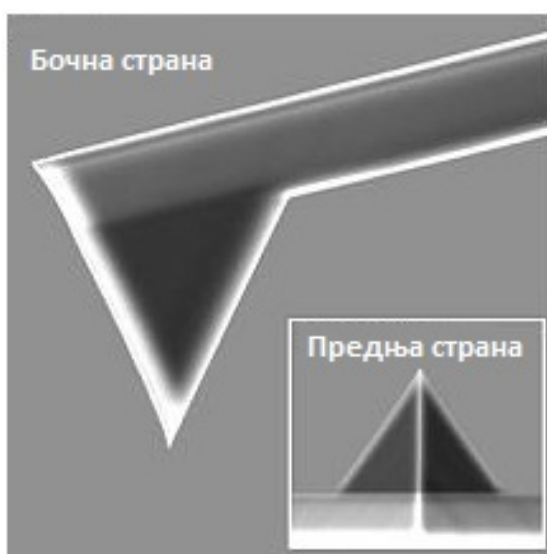
3. Рачунар са софтвером који се користи за добијање/приказивање AFM слика и њихово процесуирање и анализу.

Принцип рада AFM-а заснива се на скенирању површине узорка помоћу сонде која на свом крају има иглицу са оштрим врхом. Тим скенирањем добија се топографска мапа површине испитиваног узорка, а 3D профил мерењем отклона сонде, који потиче од интеракције врха са површином испитиваног материјала. Између врха сонде и површине узорка јављају се Van der Waals-ове међумолекулске силе, чији интензитет зависи од растојања атома сонде и узорка. На основу интензитета сила реконструира се растојање од узорка што представља основу за формирање слике добијене AFM микроскопом.



Слика 4.1. Шематски приказ AFM система (преузето и адаптирано из реф. [208]).

Основни принцип рада AFM система може се описати шематским приказом са слике 4.1. Сонда се састоји од гредице која је осетљива на силу и од иглице (врха) на слободном крају гредице. Улога врха сонде је да лаганим додиривањем површине региструје мале силе између сонде и узорка. Таква интеракција изазива деформацију гредице која се детектује оптичким системом, где је ласерски зрак усмерен је на горњу страну гредице на место где се налази врх. У зависности од отклона гредице оптички зрак се рефлектује, а затим се детектује осетљивим детектором кога чини четворосегментна фотодиода осетљива на положај (енг. *position-sensitive photodiode*). Ако је деформација гредице обичан вертикални отклон, тада ће померај светлосног зрака бити детектован у горњим или доњим сегментима фотодиоде. Ако на гредицу делују торзионе силе, тада ће отклон светлосног зрака бити детектован у левим или десним сегментима фотодиоде.



Слика 4.2. SEM слика врха сонде AFM система (преузето и адаптирано са <https://www.nanoworld.com/electrostatic-force-microscopy-afm-tip-arrow-efm>).

Материјал од којег се израђује врх сонде (слика 4.2) може бити силицијум, силицијум нитрат, дијамант или наноцев. Квалитет AFM слике зависи од облика врха који се употребљава у експерименту. Врх је доста осетљив на додире, температуру и друге материјале, тако да захтева пажљиво руковање. Такође, може се лако оштетити и у зависности од мода који се користи за скенирање.

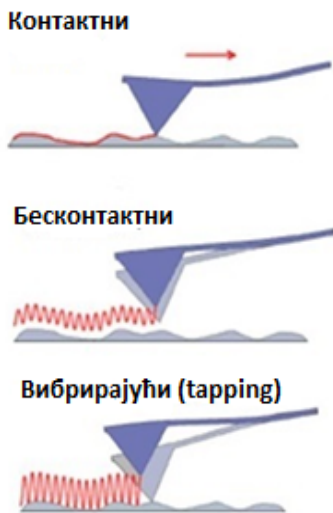
Током снимања сонда се креће преко површине узорка, који се налази на пиезоелектричном скенеру са повратном спрегом, који омогућује прецизну контролу тог кретања. Пиезоелектрични материјали претварају електрични потенцијал у механичко кретање тј. долази до промене димензија материјала када се на њега примени електрични потенцијал.

Помак гредице је пропорционалан сили која делује између врха и узорка, а величина силе зависи од константе еластичности гредице и њене удаљености од површине. Оптички систем прати отклон гредице и на тај начин интеракцијске силе које зависе од удаљености врха и површине узорка. На веома малим удаљеностима сонде од површине узорка доминантне су већ поменуте Van der Waalsове силе. Интеракције попут електростатичке и магнетске значајне су тек на већим растојањима од површине узорка.

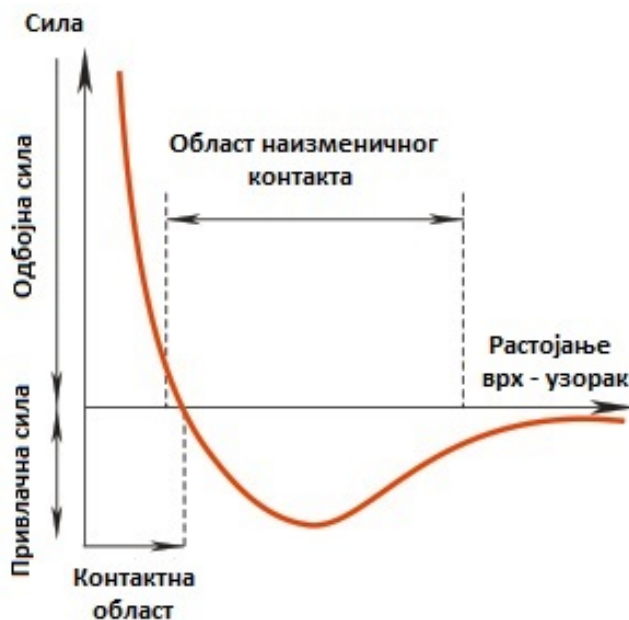
Постоји више начина рада (модова) AFM-а. Главна подела је на топографске и нетопографске начине рада. Топографски начин рада може се поделити на три основна мода, који, поред тога што имају различите експерименталне процедуре и користе се за различите узорке, могу дати различите информације и интерпретације добијених резултата. Топографски модови су приказани на слици 4.3 и могу бити [206]:

1. Контактни (удаљеност сонде од површине  $< 0,5 \text{ nm}$ )
2. Бесконтактни (удаљеност сонде од површине  $0,5 - 2 \text{ nm}$ )
3. Вибрирајући начин мерења.

#### Топографски модови AFM-а



Слика 4.3. Топографски модови AFM-а (преузето и адаптирано из реф. [206] и са <https://www.quora.com/How-does-atomic-force-microscopy-work>).



Слика 4.4. Дијаграм силе и растојања између врха и узорка (преузето и адаптирано са [https://www.ntmndt-si.com/data/media/images/spm\\_techniques/intermittent\\_contact\\_region.gif](https://www.ntmndt-si.com/data/media/images/spm_techniques/intermittent_contact_region.gif)).



**1. Контактни начин рада** је први развијени AFM мод, код кога је удаљеност сонде од површине узорка мања од 0,5 nm. Иако овај начин рада поставља одређена ограничења што се тиче избора узорка, он и даље представља веома корисну технику. Контактни мод даје слике високе резолуције, а уједно је и најбржи мод. У овом начину рада сонда најјаче осећа одбојну Van der Walls-ovu силу. Она је у сталном додиру са узорком што може довести до оштећења узорка, али и оштећења врха сонде, тако да може утицати на добијене резултате. Силе којима сонда делује на узорак у контактном моду израчунавају се Hook-овим законом [206]:

$$F = - kz , \quad (4.1)$$

где је  $F$  сила,  $k$  константа пропорционалности, а  $z$  је отклон. Због велике резолуције контактни начин рада има широку могућност употребе. Често се користи за добијање слика веома сложених структура где је потребна суб-молекуларна резолуција. Контактни мод није добар за испитивање осетљивих узорака због могућег оштећења. Међутим, многи осетљиви биолошки узорци, чак и у течном стању успешно су испитавани у овом моду. За добијање слика узорака у течном стању и слика грубих површина, контактни AFM мод има предност у односу на остале начине рада.

**2. Бесконтактни начин рада** је такав мод где се сонда, односно врх налази на растојању од 0,5 nm до 2 nm од површине узорка. Сонда осцилује изнад површине узорка фреквенцијом која је мало изнад резонантне фреквенције и амплитудом осцилација од неколико нанометара (<10 nm). За разлику од контактног начина рада где сонда најјаче осећа одбојну Van der Walls-ову силу, код бесконтактног мода сонда најјаче осећа привлачну силу у подручју од 1 до 10 nm.

У комбинацији са системом повратне спреге и осталим силама које постоје у том подручју, а које делују на смањење резонантне фреквенције сонде, амплитуда осцилација се одржава константном. У свакој тачки координатног система ( $x$ ,  $y$ ), мери се удаљеност од врха до узорка, тако да се помоћу одговарајућег софтвера може направити топографска слика површине узорка. С обзиром да врх сонде и површина узорка нису у константном додиру, не постоји опасност од њиховог оштећења, што овај начин рада чини врло погодним за испитивање површине биолошких и других осетљивих узорака [206].

**3. Вибрирајући начин рада** представља комбинацију контактног и бесконтактног мода. У вибрирајућем начину мерења, врх вибрира на малој удаљености од површине узорка, амплитудом осциловања већом од 10 nm и варијацијама између 100 nm и 200 nm.

Van der Walls-ове диполне и електростатичке силе својим деловањем доводе до повећања и смањења амплитуде осцилација, када се врх сонде приближава односно удаљује од узорка. Повећањем и смањењем силе деловања, врх сонде се приближава и удаљава од узорка мењајући угао додира са узорком (дијаграм силе и растојања између врха и узорка дат је на слици 4.4). Те промене се региструју помоћу рефлектованог ласерског снопа, а одговарајући софтвер те промене претвара у сигнал и пројектује слику површине узорка. У вибрирајућем начину рада могу се испитивати врло осетљиви узорци при чему се могу добити AFM слике врло високе резолуције. Овим начином рада, који даје предност AFM-а у односу на друге методе микроскопије, избегавају се проблеми адхезије, трења, као и електростатичких сила које често представљају потешкоћу при мерењу код неких других метода [206].

Што се тиче нетопографског начина рада, SPM микроскопи се нису користили само за добијање топографског приказа, већ и у спектроскопији, тако да и у оквиру AFM-а постоји тзв. спектроскопија силом (енг. *Force Spectroscopy*). Спектроскопија силом представља скуп техника које се користе за проучавање сила између појединачних молекула. Ове технике могу се користити за мерење механичких својстава полимерних молекула, протеина и посебно хемијских веза под утицајем торзије или истезања. Захваљујући том проучавању дошло се до значајних сазнања о механичко-хемијским паровима у ензимима, који су одговорни за контракцију мишића, транспорт у ћелије, DNK репликацију и транскрипцију, итд [206].

## 4.2. Трансмисиона електронска микроскопија

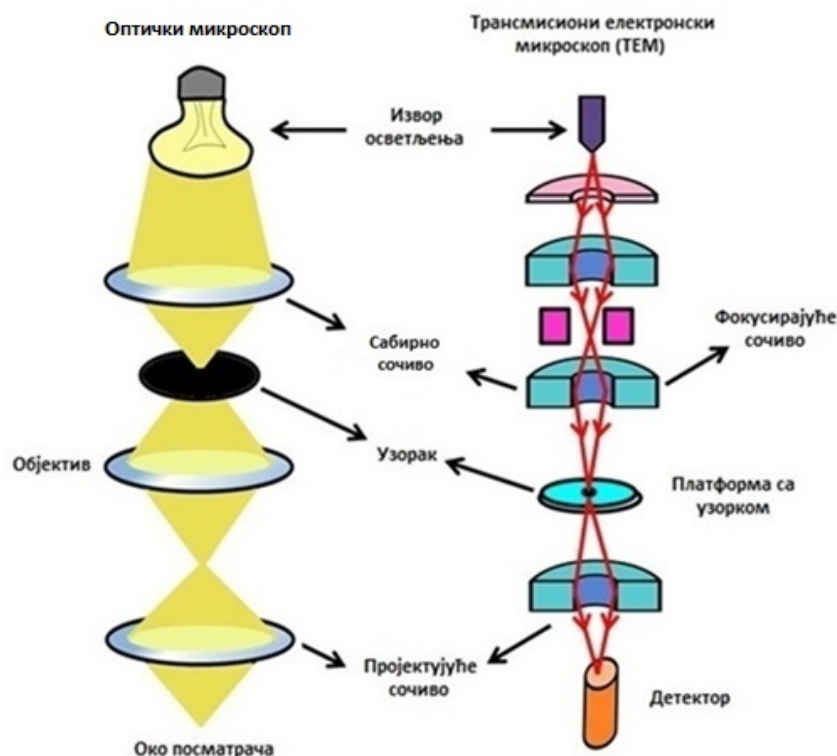
Трансмисиона електронска микроскопија (енг. *transmission electron microscopy* - TEM) је микроскопска техника којом се посматрају врло танки узорци, пропусни за електроне. Из тог разлога дебљина узорака је углавном до 1  $\mu\text{m}$ . Први електронски микроскоп (ТЕМ) конструисао је др Ernst Ruska 1931. године. Тај микроскоп је имао могућност повећања објекта посматрања 17 пута. По својој конструкцији TEM је сличан оптичком микроскопу, али ради у условима високог вакуума (слика 4.5). Као извор електронског снопа служи електронски топ.

Он се састоји од катоде (обично волфрамова нит) која загревањем емитује електроне, Wehnelt-овог цилиндра за фокусирање електронског снопа и аноде која је на значајно већем потенцијалу у односу на катоду. Због те разлике потенцијала електрони се снажно убрзавају и њихов сноп се електронским сочивом усмерава на узорак. Проласком кроз узорак, при контакту са атомима може доћи до расејања електрона. То расејање је сразмерно дебљини и густини подручја на које они наилазе. Електрони који нису расејани (распршени) формирају електронску слику узорака. Та слика се системом електронских сочива повећава и као слика приказује на флуоресцентном екрану, фотографском филму или се детектује сензором (нпр. CCD камера). Тамни делови слике одговарају дебљим и гушћим подручјима узорака [209].

ТЕМ уређаји имају доста високу резолуцију због малих de Broglie-евих таласних дужина електрона. Таласна дужина електронског зрачења је много мања од таласне дужине светлости тако да TEM микроскопи својим карактеристикама знатно надмашују могућности оптичких микроскопа. Максимална резолуција TEM микроскопа ограничена је таласном дужином зрачења које пролази кроз узорак, тако да се коришћењем мањих таласних дужина постиже већа резолуција. Резолуција код савремених TEM микроскопа иде до 0,1 nm уз повећање слике од 1,5 милиона пута. То је довољно за истраживање молекуларне структуре материјала, као и за распознавање атома у кристалима [209].

ТЕМ је идеалан за примену у више различитих области као што су нанотехнологија, медицина, биологија, испитивање материјала, металургија, форензичке анализе, итд. Слике добијене TEM-ом омогућују да се узорци виде на молекуларном нивоу, тако да се може анализирати структура материјала. TEM се може користити у полупроводничкој индустрији у производњи чипова, при идентификацији различитих недостатака и оштећења објеката. На основу TEM анализе проучавају се и различите хибридне угљеничне наноструктуре. Добијају се информације о морфологији, топографији, величини, облику и расподели честица у узорку, као и о кристалографској структури која се односи на начин уређења атома и на могуће постојање дефеката [209].





Слика 4.5. Принцип рада ТЕМ-а у поређењу са оптичким микроскопом (преузето и адаптирано са <https://nptel.ac.in/courses/102103044/>, модул 3: Микроскопске технике, лекција 18: Електронска микроскопија - II).

### 4.3. Скенирајућа електронска микроскопија и енергодисперзивна спектроскопија x - зрацима

Скенирајућа електронска микроскопија (енг. *scanning electron microscopy* - SEM) је врста микроскопије код које се фокусираним електронским снопом пречника око 5 nm прелази преко узорка, тј. врши његово врло прецизно скенирање. Приликом скенирања електрони енергије од неколико стотина до 50.000 eV продиру кроз површину, интерагују на различитим дубинама са атомима узорка и стварају сигнале који носе информације о топографији и његовом хемијском саставу (слика 4.6).

Због тога што је електронски снап врло узак, а истовремено има велику дубину продирања, SEM слике имају скоро тродимензионални изглед, што даје могућност проучавања структуре узорка. Главно својство овог микроскопа је да се узорак може посматрати директно у рефлектованом снопу електрона и то са знатно бољом резолуцијом него код оптичког микроскопа.

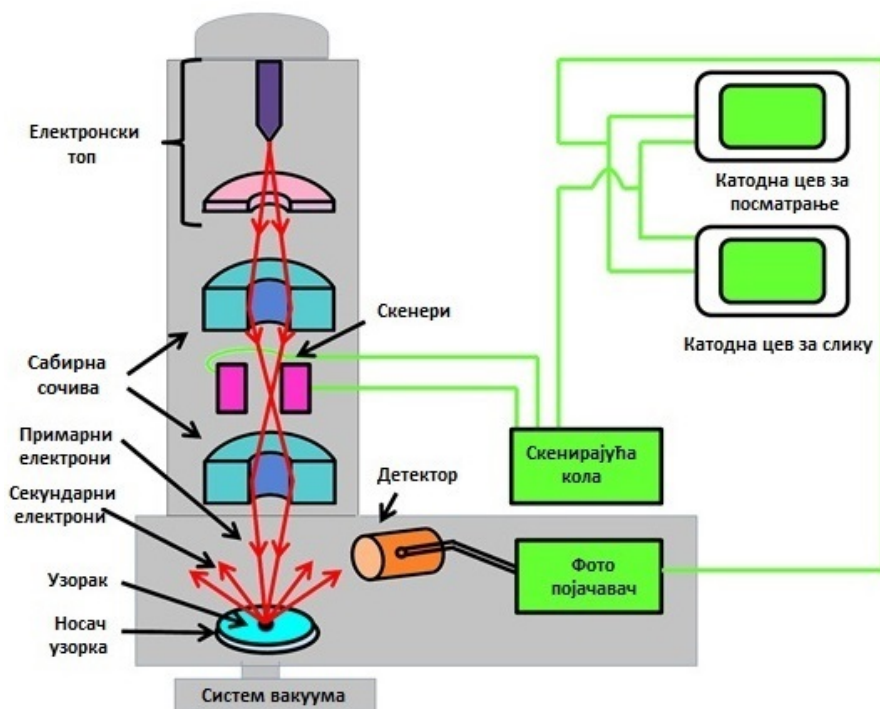
Развој SEM-а почео је касније од ТЕМ-а. Тачније, 1942. године Zworykin, Hiller и Snyder конструисали су први скенирајући електронски микроскоп. ТЕМ и SEM су слични по томе што обе микроскопије примењују електронски снап, али за стварање слике су користили потпуно другачије механизме. За разлику од ТЕМ-а који формира слику на бази електрона који пролазе кроз узорак, SEM скенира површину узорка и слику формира на бази одбијених електрона од површине узорка. Код SEM-а узорак се налази на носачу у комори микроскопа, а извор електронског снопа је катода смештена у емисионој комори (слика 4.6). Електрони се на путу између катоде и аноде под високим напоном фокусирају и убрзавају системом сочива, а затим се помоћу скенирајућих калемова фокусирају и усмеравају на површину узорка. За време рада, комора и цео систем преноса налазе се под високим вакуумом.

Приликом судара електрона са језгром атома узорка, електрони из електронског снопа микроскопа се могу одбити назад, чиме постају тзв. повратно расејани електрони (енг. *Back Scattered Electrons* - BSE). Они се детектују помоћу BSE детектора повратног расејања. BSE показује узорак у нијансама сиве боје које одговарају атомским тежинама атома који чине узорак [209].

Позиција снопа на узорку је синхронизована са пикселима слике тако да резултујућа слика представља мапу расподеле интензитета сигнала који се емитује из скениране области. Овај детектор се користи за проучавање разлика у хемијском саставу узорка и расподели елемената, а уједно смањује ефекте изазване нагомилавањем електрона на површини узорка. Из тог разлога могу се снимати и узорци који нису електрично проводни. Избијање електрона из електронског омотача атома узорка представља други важан ефекат који настаје у тренутку судара електрона из снопа и узорка. Такве електроне називамо секундарни електрони (енг. *Secondary Electrons* - SE). SE детектор приказује површину узорка у великој резолуцији и посебно је погодан за проучавање морфологије [209].

Заједно са скенирајућом електронском микроскопијом као хемијска техника микроанализе, користи се енергодисперзивна спектроскопија x-зрацима (енг. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* - EDS). Код избијања електрона из електронског омотача атома остаје празно место које се попуњава електроном из друге електронске љуске са вишом енергијом. Приликом тог преласка електрона емитује се један квант енергије или x-зрак. Енергија овако насталог зрачења карактеристична је за сваки хемијски елемент. Ову врсту зрачења детектује EDS детектор (енг. *Energy Dispersive Spectrometer* - EDS), који служи за одређивање хемијског састава узорка на бази емитованих x-зрака. Он мери релативну количину емитованих x-зрака у односу на њихову енергију.

Поред широке примене SEM микроскопије у различитим областима (медицина, хемија, биологија, испитивање материјала, машинство, геологија, итд.) коришћењем ове методе могу се добити и информације о изгледу, топографији и величини различитих хибридних угљеничних наноструктура.



Слика 4.6. Принцип рада SEM уређаја (преузето и адаптирано са <https://nptel.ac.in/courses/102103044/>, модул 3: Микроскопске технике, лекција 18: Електронска микроскопија - II).

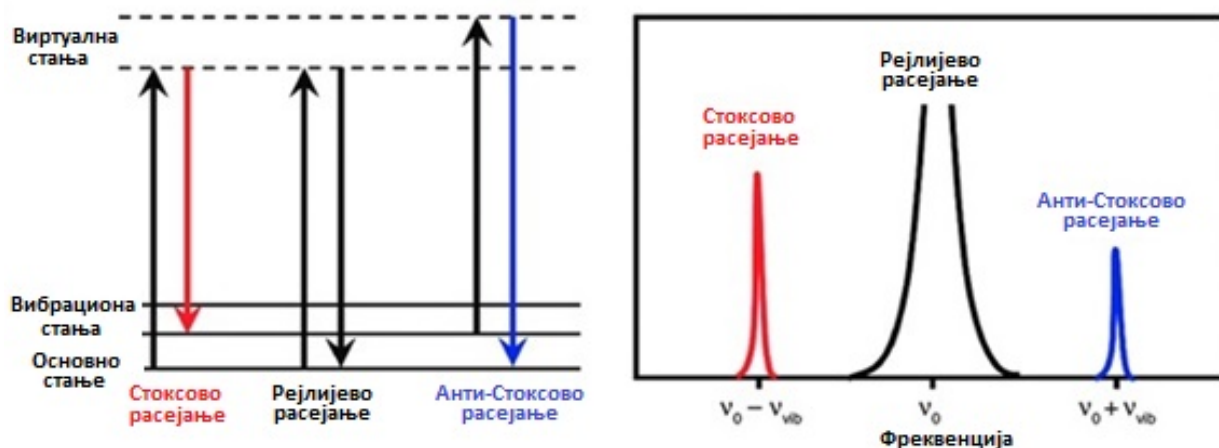
## 4.4. Раманова спектроскопија

Раманова спектроскопија је стандардна техника за анализу молекула, кристала и полупроводника, базирана на анализи нееластично расејане светлости на материјалу [210]. Раманов ефекат је уочен 1928. године од стране индијског научника Раман-а, који је први потврдио да се светлост расејава на молекулима, мењајући фреквенцију, што је по њему и названо Раманов ефекат. За то своје откриће, 1930. године је добио Нобелову награду за физику.

Приликом расејања монохроматске светлости на површину узорка, постоји могућност појаве два типа реакције (слика 4.7). Први тип реакције је нееластично Раманово расејање кога долази до размене енергије између фотона упадне светлости и молекула материјала. Као последица тога, расејани фотони имају нову фреквенцију која је једнака збиру или разлици фреквенција упадних фотона и природне фреквенције термално побуђених активних група у материјалу. Ово нееластично расејање изазива помераје у таласној дужини, што се може користити за добијање информација о материјалу.

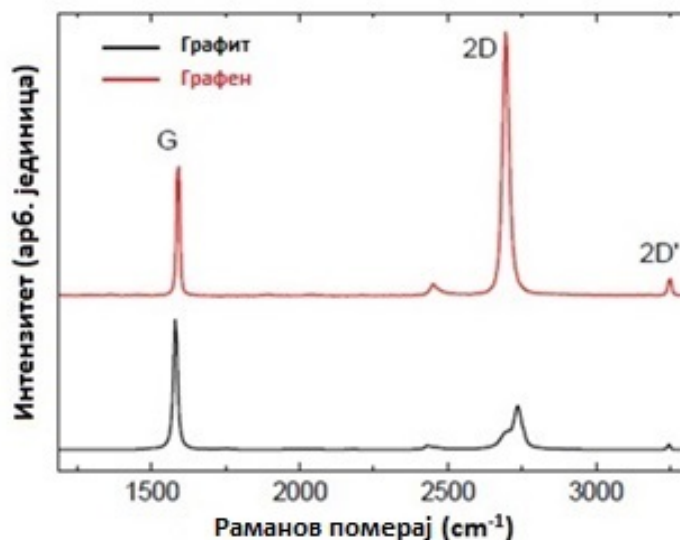
Друга врста интеракције је еластично Рејлијево расејање у коме не долази до преноса енергије или размене између фотона упадне светлости и молекула (атома) у узорку. Због тога ће расејани фотони имати исту енергију (фреквенцију) као упадна светлост.

Фотони светлости губе или добијају енергију током процеса расејања, па се услед тога таласна дужина може повећати или смањити, респективно. Ако је молекул побуђен упадним зрачењем и ако је прешао са основног на виртуелно стање, а потом се вратио на вибрационо стање, тада расејани фотон има мању енергију (фреквенцију) од упадног фотона, па самим тим и већу таласну дужину. Ово се назива Стоксово расејање. Ако је молекул на почетку у вибрационом стању, а после расејања у основном стању, тада расејани фотон има више енергије, па самим тим и већу фреквенцију тј. краћу таласну дужину. Ово се назива анти-Стоксово расејање. Померај услед Рамановог ефекта је одређен растојањем између вибрационих стања и основних стања, односно бројем фонона система. Због већег интензитета, у Рамановој спектроскопији се обично користи само Стоксова половина спектра. Својства материјала се могу утврдити анализом спектра, и/или се могу упоредити са базом података познатих спектра да би се утврдило о којем се материјалу ради [79].

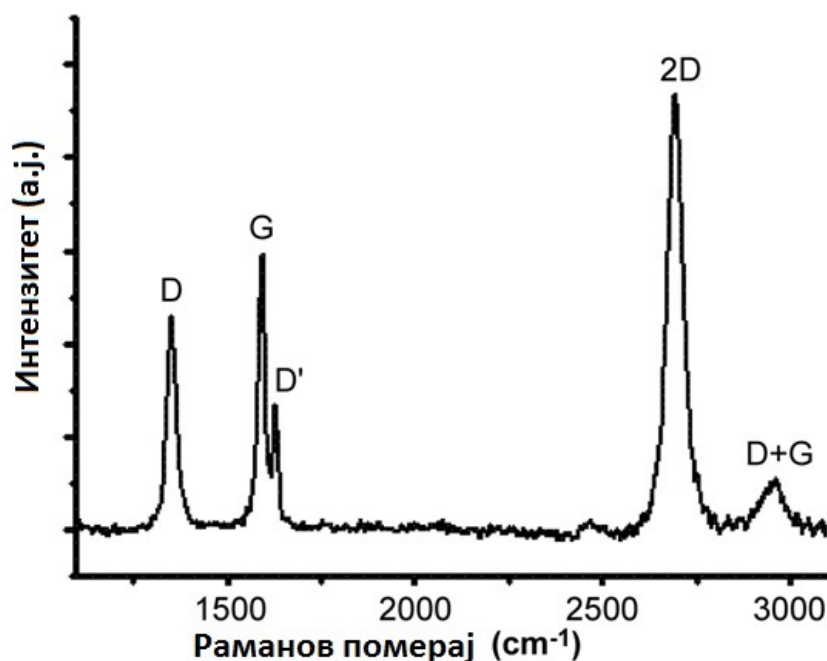


Слика 4.7. Три различите врсте расејања (преузето и адаптирано из реф. [211]).

Раманова спектроскопија је свестрана метода која се може користити за добијање информација о структурним и електричним својствима графитних материјала, као што су информације о дефектима ( $D$  трака), вибрације у равни  $sp^2$  графитних атома ( $G$  трака), као и начин слагања графенских слојева ( $G'$  трака). Најзначајније својства Рамановог спектра једнослојног графена су такозвана  $G$  трака, која се појављује на око  $1580\text{ cm}^{-1}$  и  $G'$  трака на око  $2680\text{ cm}^{-1}$ , уз коришћење ласера екситације  $2,41\text{ eV}$  (слика 4.8). Пошто је фреквенција  $G'$  траке апроксимативно два пута већа од фреквенције  $D$  траке ( $\omega_{G'} \sim 2\omega_D$ ), неки аутори је називају и  $2D$  трака [79].



Слика 4.8. Раманов спектар графена и графита мерен на  $488\text{ nm}$  (преузето и адаптирано из реф. [79]).



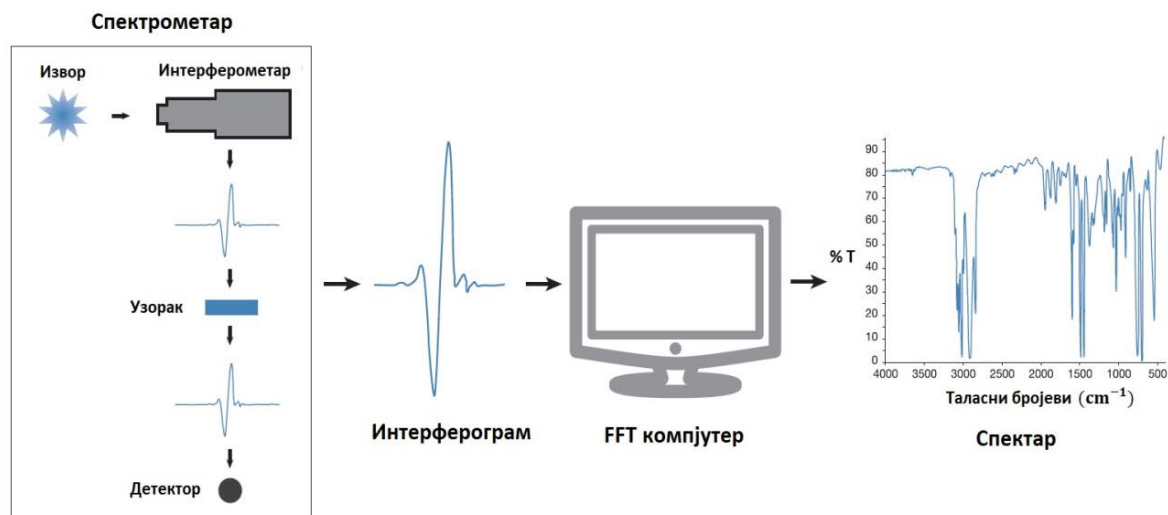
Слика 4.9. Раманов спектар ивице графена, на коме су уочљива главна својства  $D$  и  $2D$  трака, добијен енергијом ласерске екситације од  $2,41\text{ eV}$  (преузето и адаптирано са <https://archive.cnx.org/contents/f06226c5-c2a4-4798-9c75-b016acea73cd@3/characterization-of-graphene-by-raman-spectroscopy#%20cute-dog>).

У случају снимања узорка са дефектима или снимања на ивицама графена, при енергији ласерске екситације од 2,41 eV, може се на приближно  $1350\text{ cm}^{-1}$  (на половини фреквенције  $2D$  траке) уочити  $D$  трака изазвана дефектима. Уколико постоје случајне нечистоће и наелектрисања у графену  $G$  врх се може расподелити на  $G$  ( $1580\text{ cm}^{-1}$ ) и  $D'$  ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) врхове (слика 4.9). Разлог томе је што локализовани вибрациони режими нечистоћа могу интераговати проширеним фононским режимима графена. Помоћу Раманове спектроскопије могуће је проценити ниво допираности графена и утврдити разлика између  $p$  и  $n$  допираности [79].

## 4.5. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом

Инфрацрвена спектроскопија (енг. *Infrared spectroscopy* - IR) је метода која помоћу инфрацрвеног зрачења идентификује непознате супстанце. Обично се посматра апсорпција тог зрачења у зависности од таласне дужине. Да би се она применила, након озрачивања узорка инфрацрвеном светлошћу и апсорпције светлости у материјалу, атоми и молекули узорка су екситовани на више вибрационо стање. Пошто различити атоми и молекули са различитим структурама производе различите спектре, они се могу користити за идентификацију молекула.

Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енг. *Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR), је најчешће коришћена инфрацрвена спектроскопија (слика 4.10). То је метода која не оштећује узорак, бржа је, осетљивија и даје прецизније резултате у односу на неке друге методе. Ове предности потичу од употребе интерферометра, који на сигнал добијен из детектора, тј. на његов интензитет трансмитоване или рефлектоване светлости у функцији таласне дужине, примењује Фуријеову трансформацију.



Слика 4.10. Основна шема FTIR (преузето и адаптирано са [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BR50555\\_E\\_0513M\\_H\\_1.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BR50555_E_0513M_H_1.pdf)).

Добијени интерферограм се компјутерски обрађује, тј. упоређује са већ познатим спектрима различитих материјала како би се идентификовао материјал од кога је начињен испитивани узорак.



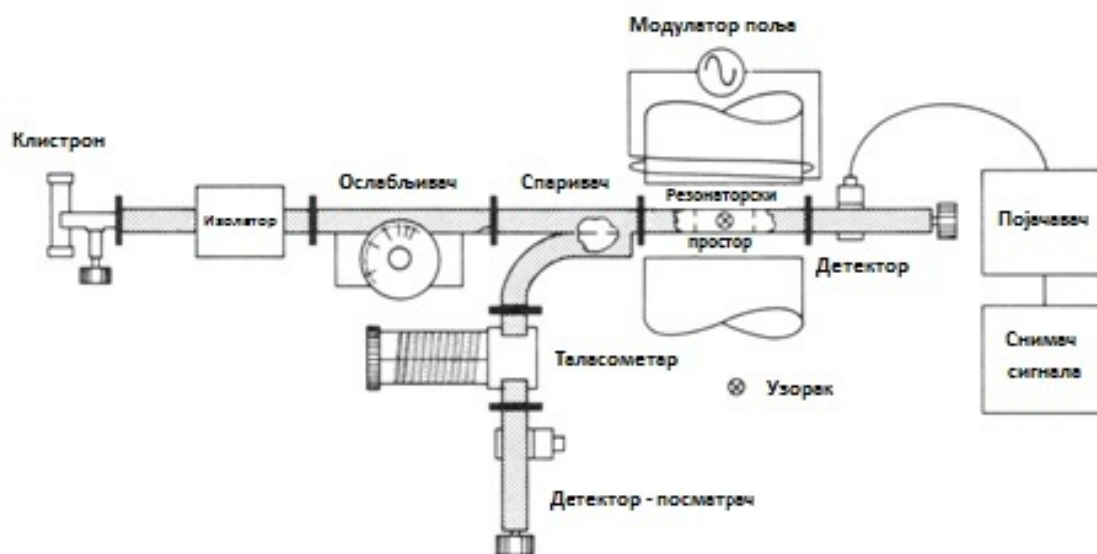
FTIR спектроскопија се користи за површинску карактеризацију у органској синтези, науци о полимерима, петрохемијском инжењерству, фармацеутској индустрији, анализи хране, као и индустрији полупроводника. Другим речима, има широк спектар апликација, од процеса праћења, до идентификације једињења и одређивања компоненти у материјалу.

За анализу се користе таласне дужине од 850 до 1300 nm, при површинским дефектима од приближно 1  $\mu\text{m}$ . Код хибридних угљеничних наноструктура FTIR се користи за анализу хемијских веза, идентификацију функционалних група на ивицама узорака, као и за детекцију присуства  $\text{sp}^2$  структуре. Помоћу ове методе може се идентификовати присуство графенске структуре у неком материјалу.

## 4.6. Електронска парамагнетна резонанца

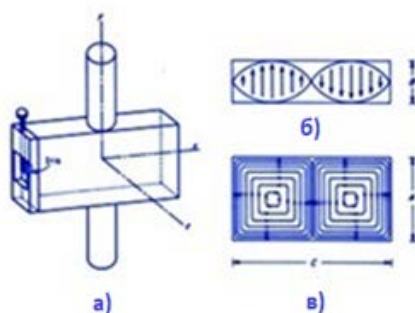
Електронска парамагнетна резонанца (енг. *electron paramagnetic resonance* - EPR) представља резонантну спектроскопску методу којом се детектује резонантна апсорпција микроталасног зрачења у хомогеном магнетном пољу. Примењује се у системима који имају најмање један неспарени електрон, а то могу бити молекули, јони радикали, разноврсни тачкасти дефекти у кристалима, итд. Ову методу открио је руски научник Yevgeny Konstantinovich Zavoisky 1944. године. Данас се често користи у области физике, хемије, медицине, биологије, с обзиром да неспарени електрони имају важну улогу у процесима као што су фотосинтеза, катализација, полимеризација, итд.

Уређај помоћу кога се може детектовати електронска парамагнетна резонанца назива се EPR спектрометар (слика 4.11). Основна разлика у односу на оптички спектрометар је што EPR као извор електромагнетног зрачења користи клистрон спектрометар, који емитује монохроматско микроталасно зрачење [212].



Слика 4.11. Шема једног EPR спектрометра (преузето и адаптирано из реф. [212]).

Узорак који се тестира, ставља се у централни део EPR система, тј. резонатор у коме се вредност магнетног поља линеарно мења (слика 4.12).



Слика 4.12. Резонаторски део EPR спектрометра а) облик резонаторског простора омогућава регулацију дотока микроталасне енергије; б) контуре линија електричног поља у  $xz$  равни; в) контуре линија магнетног поља у  $xy$  равни (преузето и адаптирано из реф. [212]).

Променом спољашњег магнетног поља успоставља се резонантни услов и тада долази до апсорпције енергије микроталаса. Услед тога долази до промене детекторске струје. Детектор је уређај на бази полупроводника који конвертује микроталасе у једносмерну струју. Овај спектрометар има и систем за модулацију, који помоћу наизменичног магнетног поља мале амплитуде трансформише једносмерни сигнал у наизменични. Наизменични сигнал се може појачати фазно осетљивим појачавачем. Фреквенција микроталаса на којој се врши EPR снимање обично износи 9,5 GHz.

У EPR спектрометрији користе се микроталаси чији вектори електричног ( $E_1$ ) и магнетног поља ( $H_1$ ) не постижу максималне вредности у истој тачки. У резонаторском простору узорак се поставља на позицију да  $H_1$  буде нормално на спољашње магнетно поље  $H$ , при чему је  $H_1$  максимално.

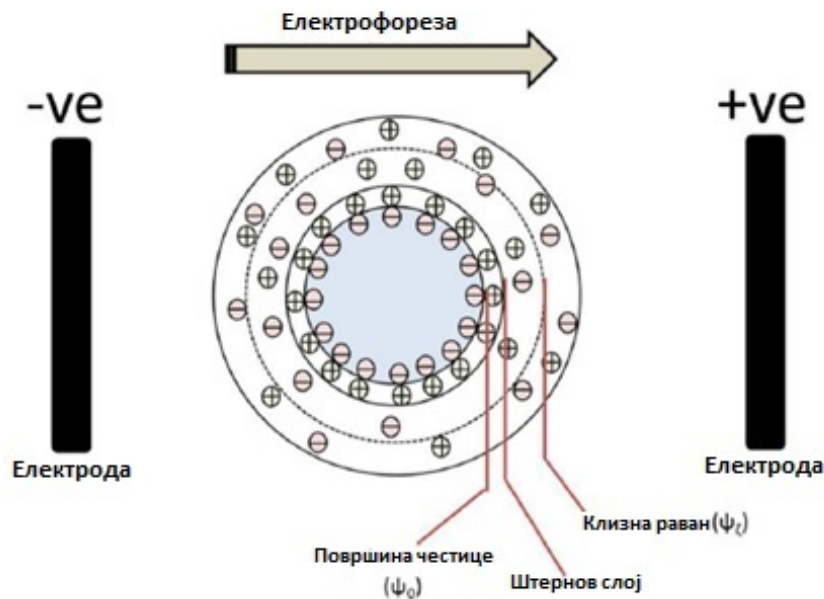
Положај узорка у резонаторском простору је веома битан за интензитет линија добијеног спектра. За мерења се користе цилиндричне кивете чија оријентација у магнетном пољу нема утицаја на интензитет EPR сигнала. Као извор микроталасног зрачења користи се клистронска цев која у зависности од напона који се на њу доводи емитује монохроматски микроталас одређене фреквенције [212].

Према најновијим истраживањима EPR спектроскопија се користи и за проучавање различитих биохемијских процеса. У комбинацији са другим биохемијским методама EPR се ефикасно примењује у испитивању механизма обољења и могуће антиоксидативне терапије, пружајући јаснији увид у различите биохемијске процесе људског организма.

## 4.7. Зета потенцијал

Зета потенцијал је научни термин за електрокинетички потенцијал у колоидним дисперзијама и представља разлику потенцијала између дисперзије средњег и стационарног слоја флуида причвршћеног за дисперговане честице. У литератури хемије колоида обично се означава грчким словом зета ( $\zeta$ ), из чега проистиче назив  $\zeta$ -потенцијал. Према научнику Sourav Bhattacharjee-у, Зета потенцијал је потенцијал на додирној површини колоидне честице која се креће унутар електричног поља [213].

Такође, Зета потенцијал се дефинише и као разлика потенцијала између електричног двослоја (енг. *electric double layer* - EDL) честица које су електрофоретски мобилне и слоја који их окружује, од дисперзанта на додирној површини [214,215].



Слика 4.13. Зета потенцијал, електрични двослој и површински напон око честице (преузето и адаптирано из реф. [214,215]).

Електрофорезом се у принципу мери кретање диспергованих честица у односу на флуид под утицајем просторно униформног електричног поља. За мерење Зета потенцијала користи се Ласерска доплерска електрофореза (LDE).

Када се електрично поље пропушта кроз дисперзију, наелектрисане честице се крећу према супротно наелектрисаној електроди (слика 4.13) и уколико кроз узорак у коме се одвија електрофореза прође ласерски зрак, фреквенција светлости одбијена од честице у покрету биће померена. Тај фреквенцијски померај се може измерити и тиме је одређена електрофоретска покретљивост  $U$  ( $m^2/Vs$ ). Зета потенцијал  $\zeta(V)$  може се израчунати помоћу једначине коју је извео Smoluchowski:  $\zeta = \mu U/\epsilon$ , где је  $\epsilon$  диелектрична константа растварача [214].

Према аутору Jingkun Jiang-у, у електричном двослоју који окружује честицу постоји додирна површина где се течност креће заједно са честицама, тако да је измерени Зета потенцијал у ствари потенцијал на овој додирној површини. Зета потенцијал није исто што и површински напон већ је то потенцијал који детерминише силу између самих честица [214].

Зета потенцијал је кључни показатељ стабилности колоидних дисперзија. Његова величина указује на степен електростатичке одбојности између суседних исто наелектрисаних честица у раствору. За молекуле и честице које су довољно мале, велики Зета потенцијал означава стабилност, тако да неће доћи до нагомилавања у раствору или дисперзији [216].

Када је потенцијал мали, снага везивања може бити већа од одбијања тако да се раствор/дисперзија може нарушити, што доводи до коагулације. Према томе, колоиди са великим Зета потенцијалом (негативним или позитивним) су електрично стабилни, док они са малим потенцијалом имају тенденцију згрушњавања или коагулације - видети табелу 4.1 [213,217].

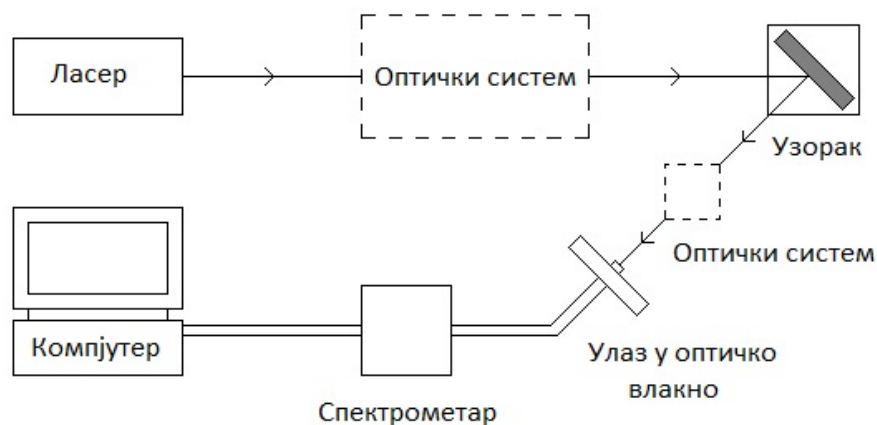


Табела 4.1. Стабилност и понашање колоида у зависности од Зета потенцијала

Зета потенцијал [mV]	Стабилност и понашање колоида
0 - $\pm 5$	Брза коагулација
$\pm 10$ - $\pm 30$	Лоша стабилност
$\pm 30$ - $\pm 40$	Средња стабилност
$\pm 40$ - $\pm 60$	Добра стабилност
Више од $\pm 61$	Одлична стабилност

## 4.8. Фотолуминесценца

За добијање информација о електронској структури узорка користи се фотолуминесцентна спектроскопија. Када се узорак осветли такозваним примарним зрачењем, долази до апсорпције упадне светлости (фотона) из UV или видљивог спектра и преноса вишка енергије. Та енергија доводи молекуле или јоне у побуђено стање. При преласку молекула или јона из виших у ниже енергетско стање, тј. из ексцитованог у равнотежно стање, настаје луминесцентна светлост односно фотолуминесценца (секундарно зрачење). Анализом спектра фотолуминесцентне светлости могу се добити важне информације о структури и својствима молекула или јона озраченог узорка, што овој методи омогућује широку научну и техничку примену (слика 4.14).



Слика 4.14. Блок дијаграм система фотолуминесцентне спектроскопије  
(преузето и адаптирано са

<https://warwick.ac.uk/fac/sci/physics/current/postgraduate/regs/mpagswarwick/ex5/techniques/optical/pl/>)

Фотолуминесценца је својство карактеристично за графенске квантне тачке, код којих она зависи од таласне дужине ексцитације. Фотолуминесценца се може поделити у две категорије: флуоресценца - луминесцентна светлост која траје док траје и ексцитација и фосфоресценца - појава да светлост тј. секундарно зрачење постоји и после престанка ексцитације [218].

За пар електрона уколико се електрони налазе у истом основном стању и имају супротне спинове, тј. њихов укупан спински број је једнак нули, кажемо да су у синглетном спинском стању. Емисија фотона из синглетног ексцитованог стања у синглетно основно стање или између било која два енергетска нивоа са истим спином назива се флуоресценца.

Међутим, могуће је да се електрон из синглетног ексцитованог трансформише у триплетно ексцитовано стање код којег укупан спински број пара електрона није једнак нули, па тада спин више не одговара основном стању. Емисија између триплетног ексцитованог стања и синглетног основног стања или између било која два енергетска нивоа која се разликују у спинским стањима, назива се фосфоресценца.

Флуоресцентна спектроскопија због високе резолуције и селективности важан је истраживачки алат у многим областима као што су хемија, биохемија, медицина, итд. Дobar пример је њена клиничка примена за лоцирање канцера и малигног ткива.

## 4.9. Ултраљубичаста и видљива апсорпциона спектроскопија

Ултраљубичаста (UV) и видљива (Vis) апсорпциона спектроскопија су најчешће примењиване технике како за квалитативну, тако и за квантитавну анализу. Ради добијања апсорпција са циљем квантитативног одређивања садржаја испитиваних материјала, користи се апсорпциона спектроскопија UV спектра (190 - 380 nm) и Vis спектра (380 - 800 nm).

Спектрофотометрија се заснива на принципу апсорпције UV и/или Vis зрачења у органским молекулима, при чему долази до преласка електрона из основног у побуђено енергетско стање, тј. долази до промене расподеле електронске густине унутар молекула, које резултира појавом одговарајућих спектра.

Постоје бројни чиниоци који утичу на апсорпцију у UV/Vis подручју. Један од њих је таласна дужина при којој молекул апсорбује енергију, а која зависи од јачине којом су везани његови електрони. Затим, утиче присуство хромофора - незасићених органских функционалних група, које имају карактеристичну оптичку апсорпцију на одређеним таласним дужинама, а на које остале групе у молекулу имају врло мали утицај. Такође, утиче и присуство ауксохрома - групе са једним или више неупарених парова електрона [219].

Најважнији делови инструмента који се примењују у апсорпционој спектрофотометрији су: монохроматор, кивете са држачима и уређај који се користи за мерење интензитета пропуштене светлости (слика 4.15). У апсорпционој спектроскопији за видљиви део спектра најчешће се користи волфрамова сијалица, док се за ултраљубичасти део спектра користи деутеријумска лампа. Монохроматор је саставни део сваког апсорпционог спектрофотометра помоћу којег се из полихроматског добија монохроматско светло, тачно одређених таласних дужина. За добијање монохроматске светлости се најчешће користи стаклена призма (Vis), кварцна призма (UV-Vis) или оптичка мрежица (UV-Vis). За видљиви део спектра кивете су стаклене, а за UV део спектра су кварцне, јер стакло не пропушта UV зрачење [219].



Слика 4.15. Основна шема UV-Vis спектрофотометра (преузето и адаптирано са [http://4.bp.blogspot.com/-uQbpRLd-m88/Ue\\_jKF13DpI/AAAAAAAAAAqE/12BMB53RByg/s1600/Simple+UV-Visible+Spectrophotometer.jpg](http://4.bp.blogspot.com/-uQbpRLd-m88/Ue_jKF13DpI/AAAAAAAAAAqE/12BMB53RByg/s1600/Simple+UV-Visible+Spectrophotometer.jpg)).

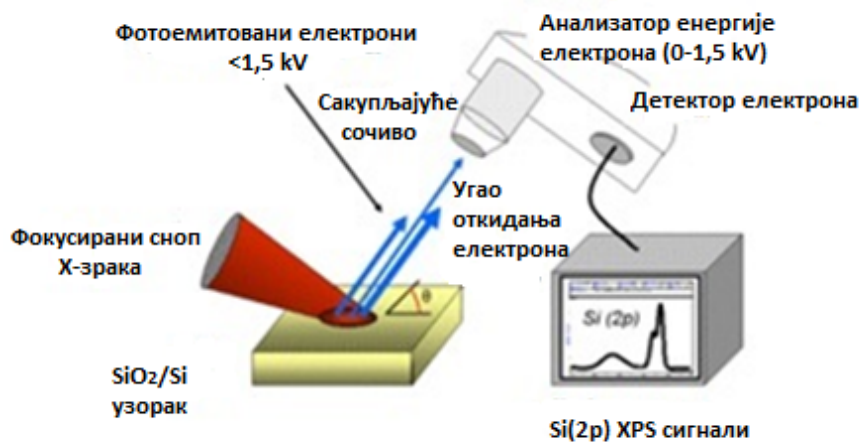
## 4.10. Рендгенска фотоелектронска спектроскопија

Рендгенска фотоелектронска спектроскопија (енг. *X-ray photoelectron spectroscopy* - XPS) спада у ред квантитативних спектроскопских техника које се могу користи за одређивање емпиријске формуле, атомског састава, као и хемијског/електронског стања елемената унутар неког материјала.

Озрачивањем материјала рендгенским снопом, уз истовремено мерење кинетичке енергије и броја електрона који се емитују са површине материјала који се анализира, добијају се XPS спектри (слика 4.16).

Дебљина испитиваног материјала је у опсегу од 1 до 10 nm. Овом техником можемо обавити хемијску анализу површине материјала у свом основном стању, или после неког нарушавања, нпр. сечења, ломљења, стругања, итд. Уколико је неопходно изложити површину материјала нагризању јонским сноповима ради његовог чишћења од површинске контаминације, онда се то ради у условима ултра високог вакуума (UHV).

XPS се такође користи и за проучавање промена насталих услед загревања материјала при излагању топлоти, промена до којих долази услед деловања реактивних гасова или раствора, као и излагања имплантата (на пример титанијумски кукови) деловању јонских снопова и ултраљубичастог зрачења [220].



Слика 4.16. Основне компоненте монохроматског XPS система (преузето и адаптирано из реф. [220]).

Помоћу XPS-а могуће је детектовати све елементе са редним бројем ( $Z$ ) већим од 3 (литијум), али се не може користити за детекцију водоника ( $Z=1$ ) или хелијума ( $Z=2$ ), јер је пречник њихових орбитала толико мали да је вероватноћа интеракције рендгенског значења са електронима који се налазе у њиховим орбиталама готово нула. При одређеним условима границе детекције за већину елемената су реда милионитог дела процента (енг. *parts per million* - ppm). Ти услови су на пример, да је дати елемент концентрисан на горњој површини или да је на располагању током дужег времена прикупљања сигнала (нпр. прикупљање сигнала током целе ноћи).

XPS се увелико користи за анализу различитих материјала, као на пример: полупроводника, полимера, неорганских једињења и елемената, металних легура, катализатора, керамика, боја, зуба, костију, медицинских имплантата, биоматеријала, вискозних уља, лепкова, јонски модификованих материјала, итд. [220].

## 5. Експериментални поступци

У овом поглављу су описана два експериментална поступка која су имала за циљ синтезу, карактеризацију и испитивање антибактеријских својстава/активности куркумин/графен хибрида (*реф.* [260]), као и антибактеријских и антибиофулинг својстава светлом побуђених флуоресцентних Лангмир-Блоцет танких слојева хидрофобних угљеничних квантних тачака (*реф.* [261]). Антибиофулинг је способност уклањања или спречавање стварања наслага микроорганизма или других материјала на различитим подлогама/површинама.

### 5.1. Синтеза куркумин/графен хибрида

#### 5.1.1. Ексфолијација графена

Електрохемијска ексфолијација НОРГ је изведена у систему две електроде користећи графитну электроду као супротну электроду и НОРГ као радну электроду [221]. Електролитски раствор је припремљен растварањем  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  у води да би се добила концентрација од 1 М. Једносмерна струја (DC) напона од +12 V је примењена на НОРГ электроду и напон је одржаван константним све док процес ексфолијације није завршен, тј. све док НОРГ електрода није потпуно истрошена. Ексфолирани производ је сакупљен вакуумском филтрацијом и испран са пуно воде да би се уклонила било која преостала со. После испирања, материјал је сакупљен и осушен у ваздуху. У даљем тексту, овај материјал ће се означавати као ЕНОРГ.

#### 5.1.2. Екстракција куркумина

Количина од приближно 50 g суве куркуме у праху (*Curcuma long L.*) постављена је у апарат за Соклет-екстракцију. Етанол (Fisher Chemical) је коришћен као екстракциони растварач. Екстракција је трајала све док се у екстрактору није избледела жута боја. Концентрација куркумина у раствору одређена је гравиметријом.

#### 5.1.3. Припрема куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ колоида

Етанолски раствор куркумина (10 ml) и ЕНОРГ колоида (40 ml) на бази воде били су помешани и сонификовани. Након тога је растворљив етанол уклоњен из раствора помоћу ротационог испаривача при 50 °C. MilliQ (двоструко дестилована) вода додавана је четири пута више, а затим доведена до почетне запремине испаравањем. Крајњи раствор је разблажен да би се добила концентрација од 2 mg/ml. У даљем тексту, овај материјал ће бити означен као куркумин-ЕНОРГ. Куркумин колоид је припремљен на исти начин са коначном концентрацијом куркумина од 4 mg/ml. ЕНОРГ колоид је припремљен ултразвучном сонификацијом праха ЕНОРГ у води и центрифугирањем [221]. Сви колоиди имају дугорочну хемијску стабилност. Сви узорци су дијализирани 4 дана коришћењем филтера од стерилних стаклених влакана за екстракцију са порама величине 1  $\mu\text{m}$ .

## 5.2. Синтеза угљеничних квантних тачака

### 5.2.1. Припрема хидрофобних угљеничних квантних тачака

Синтеза хидрофобних угљеничних квантних тачака (hУКТ) обављена је растварањем 1 g полиоксиетилен-полиоксипропилен-полиоксиетилена Pluronic 68 (Interchim, Француска) у 100 ml воде у трајању од око 15 минута. Затим је у раствор додато 200 ml фосфорне киселине (Sigma Aldrich, Немачка). Ова реакциона смеша је мешана све док није постала хомогена, а затим је загревана на магнетној мешалици на 250 °C око 120 минута. Током овог временског периода добијен је производ браон боје. После тога, реакциона смеша је охлађена на собној температури, а затим јој је додато 250 ml воде како би се добио талог браонкасто-црне боје. Затим је у смешу сипано 300 ml толуена или хлороформа (HPLC чистоћа) (Sigma Aldrich, Немачка). Вода и органска фаза се мешају на мешалици све док толуен или хлороформ не добију жуту боју. Органска фаза је затим процеђена и филтрирана.

## 5.3. Коришћене методе за депоновање узорака

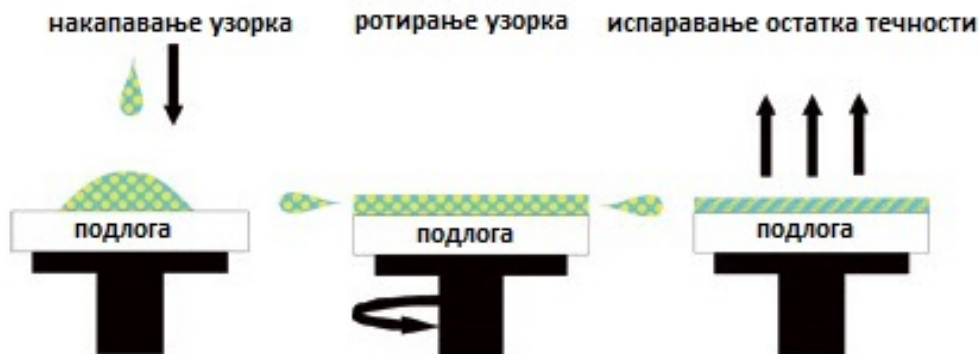
### 5.3.1. Депоновање методом спинкоатинга

Спинкоатинг (енг. *spincoating*) метода се користи да би се танки униформни слојеви (од неколико нанометара до неколико микрометара) депоновали на различите врсте подлога. Овај веома брз и једноставан поступак је нашао широку примену у областима нанотехнологије и полупроводничке индустрије, а може се користити и за превлачење подлога различитим врстама материјала.

На слици 5.1.а) приказан је уређај за спинкоатинг. Депоновање овом методом се одвија у неколико корака, као што је приказано на слици 5.1.б). Први, почетни корак је процес у којем се узорак у течном облику накапава на изабрану подлогу. Затим се узорак ротира великом брзином (око 3000 об/мин). Услед велике центрифугалне силе већина течности одлеће, тј. нестаје са површине подлоге. Када се успостави стационарно стање при ротацији, на подлози остаје само танак слој материјала. Последњи корак је процес испаравања остатка течности после чега на површини подлоге остају само молекули узорка [222].



Слика 5.1.а) Уређај за спинкоатинг

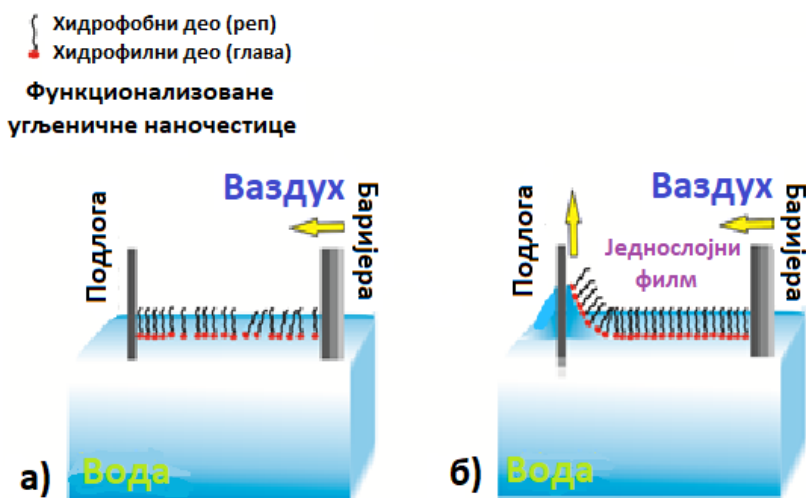


Слика 5.1.б) Фазе процеса спинкоатинга (преузето и адаптирано са <http://www.elektroonline.pl/a/7918,Powloki-antyrefleksyjne-otrzymywane-metodami-zolzel-ораз-ALD-do-zastosowan-w-krzemowych-ogniwach-slonecznych>).

Овом методом су колоиди куркумина и ЕНОРГ-а били депоновани на лискунске и силицијумске подлоге. Брзина ротирања била је 3000 об/мин, док је сушење обављено у вакууму при температури од 200 °С. Циљ коришћења ове методе био је добијање танких слојева узорака на којима се помоћу АФМ-а могу снимити појединачни слојеви куркумина на графену, а затим одредити морфолошке карактеристике [223].

### 5.3.2. Депоновање модификованом Лангмир-Блоцет техником

Танки слојеви hУКТ били су депоновани модификованом Лангмир-Блоцет (LB) техником [224,225] коришћењем компјутерски контролисаног LB уређаја (Nima Technology) (слика 5.2). Пре него што су честице проширене на водену субфазу, подлога је морала бити потопљена унутар кадице. За дистрибуцију hУКТ на међуповршину ваздух/вода LB посуде коришћен је микрошприц. hУКТ су претходно били растворени у хлороформу. После 30 минута хлороформ је испарио, а слој наночестица на површини био је сабијан до притиска 22 mN/m<sup>2</sup> између тefлонских ограничавача, што одговара површинском притиску затвореног hУКТ монослоја. За праћење површинског притиска слоја наночестица коришћена је Wilhelmy-плоча. Затим је монослој hУКТ био пребачен или на подлогу SiO<sub>2</sub>/Si или на подлогу од лискуна. Формирање hУКТ Лангмир слоја у воденој субфази праћено је Brewster угаоном микроскопијом (Model EP3, Accurion).



Слика 5.2. Шематски приказ депоновања модификованом Лангмир-Блоцет (LB) техником: а) формирање плутајућег Лангмир слоја на површини ваздух/вода; б) депоновање танког једнослојног филма на подлогу (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [225]).



Поред већ приказаног депоновања hUKT, овом техником се могу депоновати и други угљенични наноматеријали као што су фулерен (C<sub>60</sub>), наноцеви (CNT), графен и његове модификације (GO, rGO) [261].

## 5.4. Карактеризација узорака

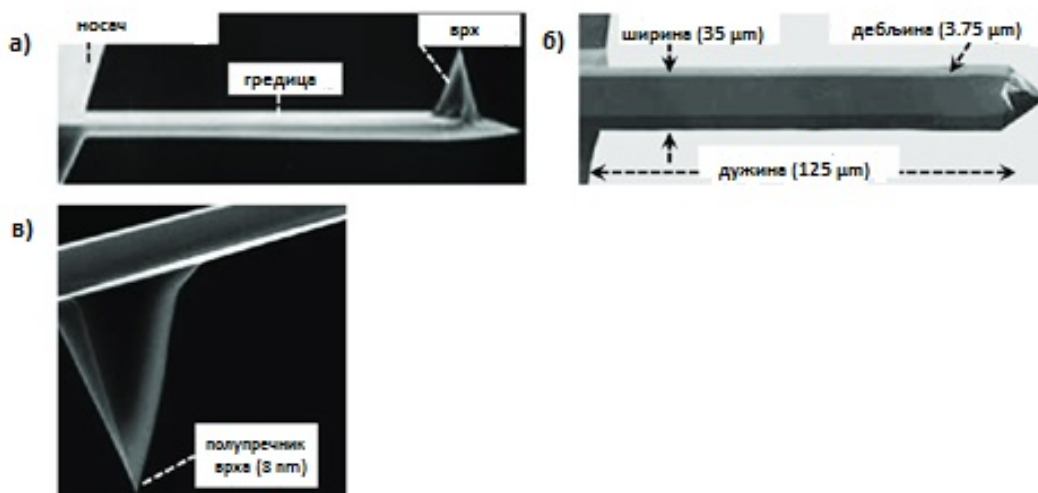
### 5.4.1. Снимање површинске морфологије узорака микроскопијом атомских сила

Микроскопијом атомских сила добијане су AFM слике помоћу којих су детерминисане морфолошке карактеристике површине узорака, као што су висина, ширина и пречник различитих угљеничних наноматеријала. У овом истраживању све AFM слике су снимљене на уређају AFM Bruker multimode - 8, који се налази у Институту за квантну физику Словачке академије наука у Братислави (слика 5.3). Све AFM слике су добијене на фреквенцији 1 Hz, са резолуцијом 512 × 512 у различитим квадратним подручјима. Режим рада био је Peak Force QNM, у условима собне температуре и ваздуха. За анализу слика коришћен је Gwyddion софтвер [226] којим су мерене бочне ивице и висине куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ узорака, LB hUKT-а танких слојева, као и одређивање средње храпавости RMS (енг. *root-mean-square roughness*) [227].



Слика 5.3. AFM Bruker multimode - 8

За снимање су коришћене силицијумске иглице (сонда) Bruker ScanAsyst (слика 5.4). На слици 5.4.а) приказана је иглица са гредицом и врхом на крају. Димензије AFM гредице и врха иглице су на сликама 5.4.б) и 5.4.в), респективно.



Слика 5.4. SEM слика силицијумске иглице за AFM: а) иглица са гредицом и врхом на једном крају; б) карактеристике гредице; в) карактеристика врха иглице који долази у контакт са силама на површини узорка (преузето и адаптирано из реф. [228]).

За идеално снимање угљеничних наноматеријала на силицијумској подлози, карактеристике ових иглица, као што су подужна константна сила од  $0,4 \text{ N/m}$  и резонантна фреквенција од  $70 \text{ kHz}$ , показале су се најповољнијим.

#### 5.4.2. Снимање морфологије узорка помоћу трансмисионе електронске микроскопије

Коришћењем TEM Philips EM 400T уређаја и TEM JEOL JEM 1210 електронског микроскопа на  $120 \text{ kV}$  (слике 5.5.а),б)), снимљене су TEM слике.



Слика 5.5.а) TEM Philips EM 400T



Слика 5.5.б) TEM JEOL JEM 1210 електронски микроскоп

Сви узорци куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ честица били су депоновани на бакарне ТЕМ мрежице превучене угљеником, а узорак hУКТ је био накапан на аморфну угљеничну мрежицу. Број шупљина мрежице био је 300, а пречник једне шупљине ~ 63  $\mu\text{m}$ .

### 5.4.3. Снимање узорака скенирајућом електронском микроскопијом и хемијска карактеризација узорака коришћењем енергодисперзивне спектроскопије x - зрацима

SEM микроскопијом добијене су слике површине узорака. На основу тих слика одређена је њихова површинска морфологија, као и хемијски састав. EDS спектроскопијом обављена је хемијска карактеризација узорака на основу којих су регистровани тежински проценти елемената присутних у узорцима.

Визуелно представљање интеракције између куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ са једне стране и бактеријских сојева са друге, изведено је коришћењем SEM JEOL JSM - 6390 LV уређаја (слика 5.6) у условима вакуума и при напону убрзања од 10 kV.



Слика 5.6. SEM JEOL JSM - 6390 LV уређај

Испитивања морфолошких промена бактеријских ћелија *S. aureus* и *E. coli* обављена су према оптимизираној верзији процедуре коју је описао Tuagi [229].

*S. aureus* суспензија од приближно  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml била је третирана са 1 mg/ml куркумина, 0,5 mg/ml ЕНОРГ и 1 mg/ml куркумин-ЕНОРГ. Суспензија која није третирана коришћена је као контролна суспензија. *E. coli* суспензија била је третирана са 2 mg/ml куркумина, 0,5 mg/ml ЕНОРГ и 1 mg/ml куркумин-ЕНОРГ или је нетретирана ради контроле. Суспензије су биле инкубирание додатних 8 сати на 37 °C, затим сакупљене центрифугирањем (6000 rpm, 10 минута на 4 °C), а затим преко ноћи фиксирание са 2,5% глутаралдехида, при температури од 4 °C.

Добијене бактерије су испране три пута са 0,1 М натријум фосфатним пуфером (pH 7,2) и дехидриране са градираном серијом етанола 25%, 50%, 75%, 90% и 2 x 100%, у трајању од 15 минута за сваки узорак појединачно. Дехидрирани узорци су одмах осушени, након чега су депоновани на SEM подлоге.

Сви припремљени узорци бактеријских сојева (третирани куркумином, ЕНОРГ-ом, куркумин-ЕНОРГ-ом и контролни) били су прекривени златом помоћу Baltec scd 005 распршивача, а затим снимљени на собној температури. Узорци су били означени као: *E. coli* контрола-ЕСС и *S. aureus* контрола-SAC, третирани са куркумин-ЕССУ, и SACU, третирани са ЕНОРГ-ЕСЕНОРГ и SAЕНОРГ, третирани са куркумин-ЕНОРГ-ЕССУЕНОРГ и SACУЕНОРГ, респективно.

Хемијска карактеризација узорака добијена је помоћу EDS Oxford Aztec X-max уређаја. Скенирана површина износила је  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ .

#### 5.4.4. Раманова спектроскопија узорака куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ

Раманови спектри куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ добијени су DXR Раман микроскопом (Thermo Scientific) при коришћењу ласера са екситацијом 532 nm и снагом од 5 mW (слика 5.7). Спектрална резолуција инструмента била је  $1 \text{ cm}^{-1}$ , док је време снимања било  $10 \times 10 \text{ s}$ . Раманови спектри забележени су на собној температури, док су сви узорци били депоновани на силицијумске подлоге.

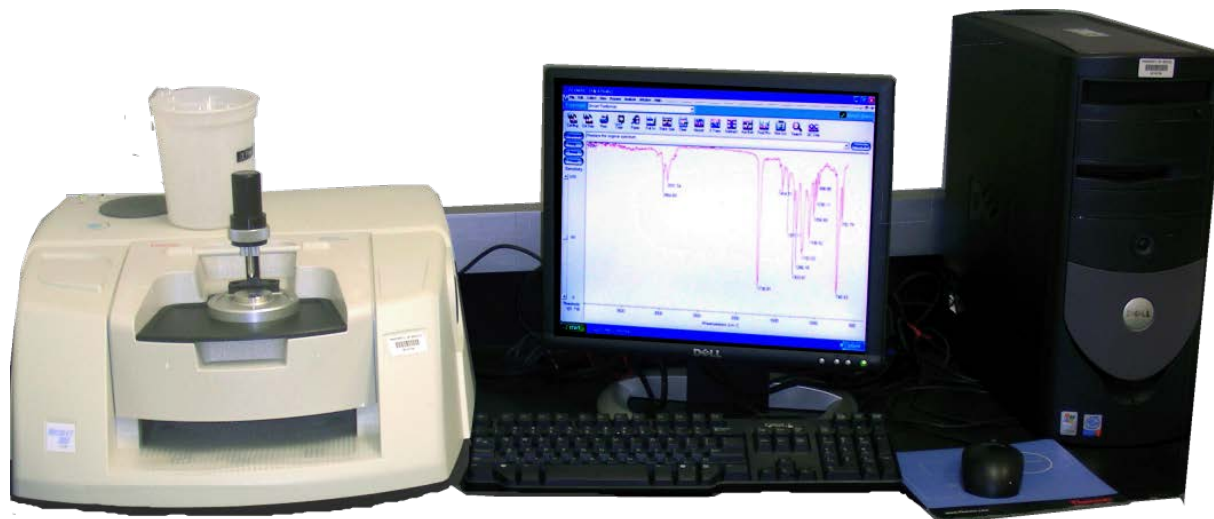


Слика 5.7. DXR Раманов уређај произвођача Thermo Scientific



### 5.4.5. Инфрацрвена спектроскопија узорака куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ

Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR) спектра куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ у Калијум бромид (КВг) дисковима, обављена је помоћу Thermo Nicolet Avatar 370 спектрометра (слика 5.8) на собној температури и у спектралном опсегу од 400 до 4000  $\text{cm}^{-1}$ .



Слика 5.8. *Thermo Nicolet Avatar 370 FTIR спектрометар*

КВг дискови су направљени мешањем 150 mg КВг праха и 1 mg куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ праха, респективно, при спектралној резолуцији 4  $\text{cm}^{-1}$ .

За мерење микро АТР FTIR спектра hУКТ танких слојева депонованих на температури околине коришћен је Nicolet 8700 спектрометар са спектралном резолуцијом од 4  $\text{cm}^{-1}$ . Слојеви су депоновани на алуминијумској фолији, док су АТР FTIR мерења спроведена у спектралном опсегу од 400 до 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.4.6. Анализе електронске парамагнетне резонанце hУКТ колоида

Анализе електронске парамагнетне резонанце (EPR) су изведене на собној температури употребом EPR спектрометра MiniScore 5000 (Magnettech, Берлин, Немачка) (слика 5.9), на номиналној фреквенцији од 9.5 GHz. Снага микроталаса била је 1 mW (микроталасно слабење од 20 dB), са амплитудом модулације од 0,2 mT. UV зрачење је изведено у оквиру EPR резонатора кроз прозор зрачења, користећи Hamamatsu LC8 тачкасти извор светлости, типа L9566-01, зрачећи у опсегу таласних дужина од 300 до 450 nm.

Формирање синглетног кисеоника ( $^1\text{O}_2$ ) праћено је специфичном реакцијом између  $^1\text{O}_2$  и 2,2,6,6-тетраметилпиперидина (TEMР) при којој је формиран стабилан радикал TEMР- $^1\text{O}_2$  (или TEMРО). Узорци у концентрацији од 0,2 тежинског удела, помешани су са TEMР у коначној концентрацији од 30 mM. Припремљене смеше су биле zasiћене ваздухом пре мерења EPR. Све три мешавине су мерене пре и током излагања светлости. Ове смеше су биле изложене UV-Vis светлости ( $\lambda > 300 \text{ nm}$ ) током 10 минута.

Способност дисперзија да произведу хидроксил ( $\text{HO}^\bullet$ ) и супероксид ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) радикале, испитивана је коришћењем 5,5-диметил-1-пиролин-N-оксида (DMРО) као спинског трапа (спинска клопка) за обе врсте радикала. За EPR мерења, припремљене су мешавине DMРО коначне концентрација 100 mM и узорака, где је концентрација материјала 0,5 mg/ml.

Као контрола коришћен је DMPO раствор и Фентон реакција са DMPO. Фентон реакција је припремљена мешањем 30  $\mu\text{FeCl}_2$  (концентрација од 1 mM) и 20  $\mu\text{l H}_2\text{O}_2$  (концентрација 10 mM) са DMPO.



Слика 5.9. EPR спектрометар MiniScope 5000, Magnetech

Генерисање синглетног кисеоника у органским растворима и на површинама праћено је EPR мерењима hUKT колоида. Сва мерења су била обављена на температури околине користећи Magnetech спектрометар, који ради на номиналној фреквенцији од 9,5 GHz. Коришћена је смеша која садржи 0,18 ml TMP (Sigma) и 2 ml MilliQ воде.

Кап запремине од 100  $\mu\text{l}$  hUKT слоја била је разливена на површину  $\text{SiO}_2/\text{Si}$ . Плаво светло таласне дужине 470 nm и снаге 15 W коришћено је за два зрачења слојева на собној температури. Минијатурне капи (30  $\mu\text{l}$ ) мешавине TMP воде су узети са површине и пренети у кварцне цевчице унутрашњег пречника 3 mm. Након тога TEMPO сигнал је био анализиран EPR-ом. Да би се квантификовали EPR сигнали, израчуната је средња вредност њихове амплитуде и добијени подаци су представљени у произвољним јединицама.

Сличан поступак је примењен при одређивању генерисања синглетног кисеоника помоћу hUKT колоида у хлороформу.

#### **5.4.7. Мерење зета потенцијала узорака куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ**

Зета потенцијал ( $\zeta$ -потенцијал) колоида куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ је анализиран помоћу DLS-а (Dynamic light scattering) коришћењем Зетасазер Нано - ZS (Malvern Instruments, Велика Британија) (слика 5.10), опремљеним 4 mW хелијум/неонским ласером ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) и термо-електричним контролером температуре.

Параметри постављени за графенске колоидне честице били су: индекс преламања 2,67, апсорпција 0,01 и вискозност 0,89 cP.

Сва мерења била су изведена на температури од 25 °C. Вредност зета потенцијала је израчуната као просечна вредност добијена у пет мерења.



Слика 5.10. *Зетасажер Нано - ZS, Malvern Instruments*

#### **5.4.8. Фотолуминесцентна мерења hУКТ колоида и UV-Vis спектроскопија узорака**

За PL мапирање слојева коришћен је конфокални Раманов микроскоп (Alpha 300 R, Witec) у режиму скенирања (слика 5.11). Тиме је спроведен процес потврђивања хомогености слојева депонованих LB hУКТ на већим површинама. UV ексцитациони ласер на таласној дужини од 355 nm, био је фокусиран на узорак ахроматичним оптичким објективом са  $NA=0,8$  (50 x).

Просторно распоређени PL hУКТ слојеви анализирају се спектрометром са спојеним влакнима који користи оптичку решетку са 150 g/mm и Peltier-хлађени CCD чип. Скенирана површина је подешена на  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  са густином тачака 100 x 100.



Слика 5.11. *Раманов микроскоп Alpha 300 R, Witec*



RF-5301PC (Shimadzu, Japan) спектрофлуорофотометар (слика 5.12) коришћен је за мерење PL спектра hUKT колоида. Таласна дужина побуде постављена је у распону од 320 до 480 nm.

Кварцне лабораторијске посуде (кивете) величине 1 cm × 1 cm биле су постављене у распореду правоугла или троугласте кивете у случају високе концентрације сонде, коришћене су за мерење PL hUKT колоида. За PL мерења, концентрација hUKT била је 0,3 mg/ml.



Слика 5.12. RF-5301PC, Shimadzu

Shimadzu UV-Vis-NIR SolidSpec 3700 спектрофотометар (Shimadzu Corporation, Токио, Јапан) (слика 5.13) био је коришћен за мерење UV-Vis спектра колоида hUKT у опсегу од 200 до 500 nm и на собној температури. Концентрација hUKT била је 0,1 mg/ml.

UV-Vis апсорпциони спектар узорака раствора куркумин/графен хибрида мерени су на 20 °C у опсегу од 200 до 800 nm и са кораком од 1 nm. Сви узорци су били припремљени са MilliQ водом у концентрацији од 0,5 mg/ml.



Слика 5.13. UV Vis NIR SolidSpec -3700, Shimadzu

### 5.4.9. Рендгенска фотоелектронска спектроскопија hУКТ танких слојева

XPS hУКТ танких слојева су урађени на Thermo Scientific K-Alpha XPS систему (Thermo Fisher Scientific) (слика 5.14), при чему је коришћен монохроматски Al K $\alpha$  извор X-зрака ( $h\nu=1486,6$  eV). Пречник рендгенског зрака на узорку био је постављен на 400  $\mu\text{m}$ . XPS спектри високе резолуције су добијени коришћењем 50 eV упадне енергије снопа са енергетским кораком од 100 meV. Подаци XPS-а су процењивани Thermo Scientific Avantage софтвером.



Слика 5.14. *Thermo Scientific K-Alpha XPS систем, Thermo Fisher Scientific*

### 5.4.10. Антибактеријске активности

Антибактеријске активности куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ биле су спроведене према сојевима бактерија *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923. Изабране врсте бактерија потичу из ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Култивација/тест медијум за тестиране сојеве бактерија био је Mueller Hinton Broth (МНВ)/Agar (МНА) (HiMedia Laboratories, India). Концентрације сојева бактерија од око  $10^5$ - $10^6$  CFU ml засејане су преко ноћи, а затим су коришћене за тестирање антибактеријских активности.

Антибактеријске активности hУКТ танких слојева тестиране су на *E. coli* ССМ 4517 и *S. aureus* ССМ 4516. Коришћени сојеви бактерија потичу из ССМ (чешка колекција микроорганизама). Испитане су две врсте узорака: а) LB hУКТ танки слојеви депоновани на стакло - стерилизација пре третмана UV светлом (258 nm) током 30 минута; б) референца - чисто стакло - стерилизација пре третмана потапањем у 70% етанола. Сви узорци третирани су плавим светлом на 470 nm снаге 15 W у трајању од 1 час. Узорци су били постављени на растојање 50 cm од лампе.

#### 5.4.10.1. Утицај куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ колоида на раст ћелија праћен мерењем оптичке густине

Колоиди куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ са концентрацијама 4 mg/ml, 1 mg/ml и 2 mg/ml, респективно, стерилисани су гама зрачењем у дози од 10 kGy и употребљени су за испитивање кинетике бактеријског раста коришћењем плоча са 96 рупа. рН припремљених колоида били су подешени на вредност 7. Плоче испуњене са 100  $\mu$ l двоструко серијски разблаженим узорцима у води биле су испуњене са 100 ml бактеријске суспензије. Концентрације куркумина кретале су се од 0,125 до 2 mg/ml за ЕНОРГ од 0,125 до 0,5 mg/ml за куркумин-ЕНОРГ од 0,125 до 1 mg/ml. Негативне контроле биле су почетни медијум за раст куркумин-а, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ-а док је МН мешавина са тестираним бактеријама служила као позитивна контрола. Читач микроплоче (ELx808, BioTek Instruments, Inc., САД) контролисан Gen5™ софтвером (слика 5.15), коришћен је за праћење раста ћелија мерењем замућености OD<sub>630</sub> на сваких 60 минута током 24 часа. Плоча је била протресена 10 секунди пре сваког читавања. OD<sub>630</sub> је коригован за вредност оптичке густине (енг. *optical density* - OD) негативне контроле у истој тачки мерења.



Слика 5.15. Читач микроплоче ELx808, BioTek Instruments, Inc.

#### 5.4.10.2. Раст бактерија у присуству куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ колоида одређеног бројем бактерија одрживих у животу

Раст бактерија у присуству куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ био је одређен поступком макро-разблаживања са благом модификацијом у односу на протокол Клапчњик-а [230]. Куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ су разблажени у 1 ml *S. aureus* суспензије да би достигли ниво концентрације од 0,25 до 2 mg/ml, од 0,25 до 1 mg/ml и 0,5 mg/ml, респективно. Слично претходном, куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ били су додати у 1 ml *E. coli* суспензије ради добијања коначних концентрација од 2 mg/ml, 1 mg/ml и 0,5 mg/ml, респективно. Ове концентрације су одабране према резултатима претходног теста (OD).

Број тестираних бактерија одрживих у животу одређен је узимањем узорака на почетку и после 3, 6, 9 и 24 часа и узимањем количине од 10 - 100  $\mu\text{l}$  на МНА након серијских разблаживања узорака. Плоче су инкубиране под аеробним условима на 37 °C током 24 сата. Позитивне контроле биле су припремљене на исти начин, али без додавања куркумина, ЕНОРГ или куркумин-ЕНОРГ. Број тестираних бактерија изражен као  $\log_{10}$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ , израчунат је узимајући у обзир разблаживање узорака и одливену количину на МНА. Сви експерименти су изведени у трипликату, а затим су израчунате средње вредности  $\log_{10}$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ , као и стандардне девијације.

#### 5.4.10.3. Методологија за одређивање антибактеријске активности

Антибактеријска активност је процењена у складу са ISO 22196 "Мерење антибактеријске активности на пластичним и другим непорозним површинама" уз одређене модификације. Модификација се примењује на мању величину тестираних узорака од ISO прописа. Димензија узорака била је 20 mm x 10 mm. Поставка теста подешена је тако да одговара мањој величини узорка. Коришћени инокулум са концентрацијом бактерија *S. aureus* био је  $7,8 \times 10^6$  CFU/mL, а *E. coli*  $2,0 \times 10^7$  CFU/ml. Антибактеријска активност свих испитаних узорака међусобно је упоређивана. Следећа једначина коришћена је за израчунавање броја преживелих бактерија које се регенеришу по  $\text{cm}^2$  и по узорку:

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A, \quad (5.1)$$

где је C - просечна вредност апсорпције за одређену рупу у плочи; D - бројна вредност разблажења у одређеној рупи у плочи; V - запремина (ml) бактеријског буфера SCDLP који се додаје у раствор; A - површина ( $\text{mm}^2$ ) слоја LB hUKT. За израчунавање антибактеријске активности коришћена је следећа једначина:

$$R = U_t - A_t, \quad (5.2)$$

где су  $U_t$  - средња вредност заједничког логаритма броја преживелих бактерија ( $\text{ћелија}/\text{cm}^2$ ) који се опоравио на нетретираним узорцима након 24 часа;  $A_t$  - средња вредност заједничког логаритма броја преживелих бактерија ( $\text{ћелија}/\text{cm}^2$ ) који се опоравио на третираним узорцима након 24 часа.

#### 5.4.10.4. Квантификација формирања биослоја и ефекат хидрофобних угљеничних квантних тачака на формиране биослојеве

Два бактеријска соја (*B. cereus* ССМ 2010 и *P. aeruginosa* ССМ3955) су коришћена за испитивање антибиофулинг ефекта LB hUKT танких слојева. Одабране врсте бактерија потичу од ССМ (чешка колекција микро-организама). Бактерије су узгајане на Nutrient agar No.2 са глукозом (HiMedia, India). Бактерија *B. cereus* инкубирана је на 37 °C током 24 часа, а *P. aeruginosa* на 30 °C током 48 часова. Засејавањем бактеријских сојева у физиолошки раствор, припремљене су бактеријске суспензије. Густина суспензија модификована је на денситометру (Biosan) до другог степена McFarland стандарда. Узорци су стерилисани коришћењем UV светлости у трајању од 30 минута.

2 ml Trypton soya Broth (HiMedia, India) пипетиран је у сваку Petri посуду са узорцима (TPP, Швајцарска). После тога, био је засејан са 20  $\mu\text{l}$  бактеријских суспензија. Petri посуђе са узорцима је инкубирано према захтевима појединачних бактеријских сојева на 30 °C (*P. aeruginosa*) и 37 °C (*B. cereus*) у трајању од 48 часова.

Садржај Petri посуда уклоњен је након инкубације. Узорци су били испрани физиолошким раствором, а затим осушени на ваздуху. За ослобађање ћелија са површине, пипетирано је 100  $\mu\text{l}$  биолошке воде + 100  $\mu\text{l}$  екстракта В/С (BioThema, Шведска) на површину узорака. Затим је 40  $\mu\text{l}$  овог раствора пипетирано у Eppendorf епрувету са 160  $\mu\text{l}$  LАТР Реагенс HS + разблаживача В (BioThema, Шведска).

Емисија светлости ( $I_{\text{smp}1/2}$ ) мерена је на Луминометру (Turner BioSystems) (слика 5.16). У Eppendorf епрувету додато је 10  $\mu\text{l}$  од 100 nmol/l АТР Standard (BioThema, Шведска), а затим је емисија светлости још једном измерена ( $I_{\text{smp}+\text{std}}$ ). Количина аденозин трифосфата (АТР) израчуната је у узорку преко једначине:

$$\text{АТР}_{\text{smp}} = I_{\text{smp}1} / (I_{\text{smp}+\text{std}} - I_{\text{smp}2}). \quad (7.3)$$

За испитивање антибиофулинског ефекта танких слојева LB hУКТ коришћено је плаво светло на 470 nm снаге 15 W. Након 24 часа инкубације испитивани узорци су осветљени плавом светлосћу у трајању од 2 часа са висине од 50 cm. Затим су узорци инкубирани додатна 24 часа. Статистичке разлике су одређене неупареним t-тестом.



Слика 5.16. Луминометар, Turner BioSystems Inc.

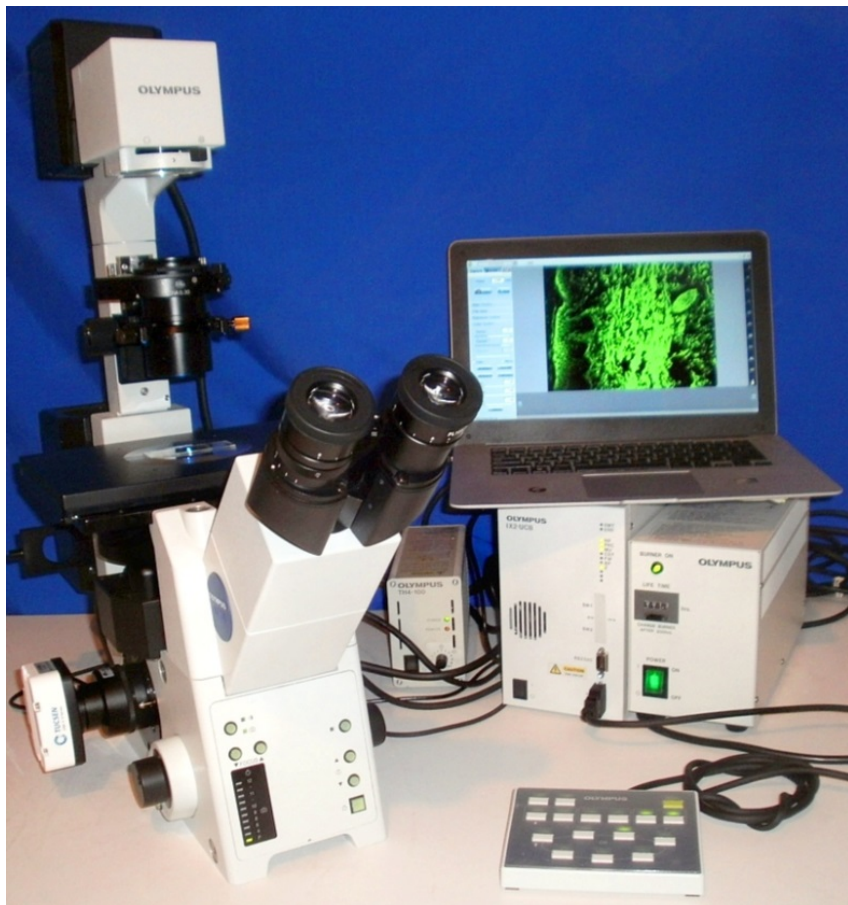
#### 5.4.11. Цитотоксичност

LB hУКТ танки слојеви били су осветљени плавим светлом на 470 nm снаге 15 W током 2, 4 и 6 часа. Њихов утицај на раст линије ћелија ембрионог фибробласта миша (ATCC CRL-1658 НИН/3Т3, САД) методом МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид), измерен је на 570 nm, а референтна таласна дужина је била подешена на 690 nm. Као медијум за културу коришћен је Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Аустрија) из АТСС-а. Он садржи 10% телећег серума (BioSera, Француска) и 100 U ml<sup>-1</sup> пеницилина/стрептомицина (GE Healthcare HyClone, Велика Британија). Ћелије су инкубирани на 37 °C у 5% CO<sub>2</sub> у влажном ваздуху. За одређивање ћелијске морфологије DNК су обојене са Hoechst 33258 (Invitrogen, САД). Ћелије су фиксирани и пермеабилizовани пре бојења. Ћелије су фиксирани помоћу 4% формалдехида (Penta, Чешка) у трајању од 15 минута, опране помоћу PBS (фосфатни буфер серум), а након тога је сипано 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, САД) током пет минута до пермеабилizације. Затим су ћелије 3 пута испирани PBS-ом (Invitrogen, САД). Потребна количина PBS и 5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33258 додата је и остављена да се инкубира у мраку у трајању од 30 минута.



Цитотоксичност је представљена као смањење преживљавања ћелија (%) у поређењу са ћелијама које се култивишу у медијуму без екстракта испитаних материјала. Инверзни Olympus фазни контрастни микроскоп (IX 81) коришћен је за визуелно представљање ћелијске морфологије на плочама где је засејана култура (слика 5.17).

Концентрација ћелија која је засејана на узорцима била је  $2,5 \times 10^4$  ћелија/ $\text{cm}^2$ . Статистичке разлике су одређене коришћењем неупареног т-теста.



Слика 5.17. Инверзни фазни контрастни микроскоп, Olympus IX 81

#### 5.4.12. Губитак материјала који апсорбује светлост на 260 nm

Екстрацелуларни 260 nm апсорпциони материјал ослобођен од стране ћелија био је одређен коришћењем незнатно модификованог поступка који је описао Carson [230]. Узете су бактеријске суспензије (узорак пре третмана) од приближно  $10^5$ - $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ , које су разблажене у односу 1:100, а затим и исфилтриране кроз поре филтера величине 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Немачка). Куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ били су додати у 1 ml *S. aureus* суспензије ради достигања крајње концентрације од 1 mg/ml и 0,5 mg/ml, респективно. Ћелије без узорака употребљене су за контролу.

Сви узорци били су инкубирани на 37 °C. Додатне количине третираних и контролних ћелијских суспензија биле су уклоњене после 4 и 8 часова, а затим разблажене и профилирание како је претходно описано.

Ослобађање UV-апсорбујућег материјала измерено је коришћењем Shimadzu UV-1800 UV-Vis спектрофотометра (слика 5.18). Добијени резултати мерења на 260 nm у сваком тренутку су изражени као пропорција почетне вредности OD<sub>260</sub>. Анализа је изведена у трипликатима.



Слика 5.18. *UV-Vis* спектрофотометар, Shimadzu UV-1800



## 6. Резултати и дискусија

У овом поглављу су представљени и анализирани резултати два експериментална поступка која су имала за циљ синтезу, карактеризацију и испитивање антибактеријских својстава/активности куркумин/графен хибрида (реф. [260]), као и антибактеријских и антибиофулинг својстава светлом побуђених флуоресцентних Лангмир-Блоџет танких слојева хидрофобних угљеничних квантних тачака (реф. [261]).

### 6.1. Куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ

#### 6.1.1. Површинска морфологија

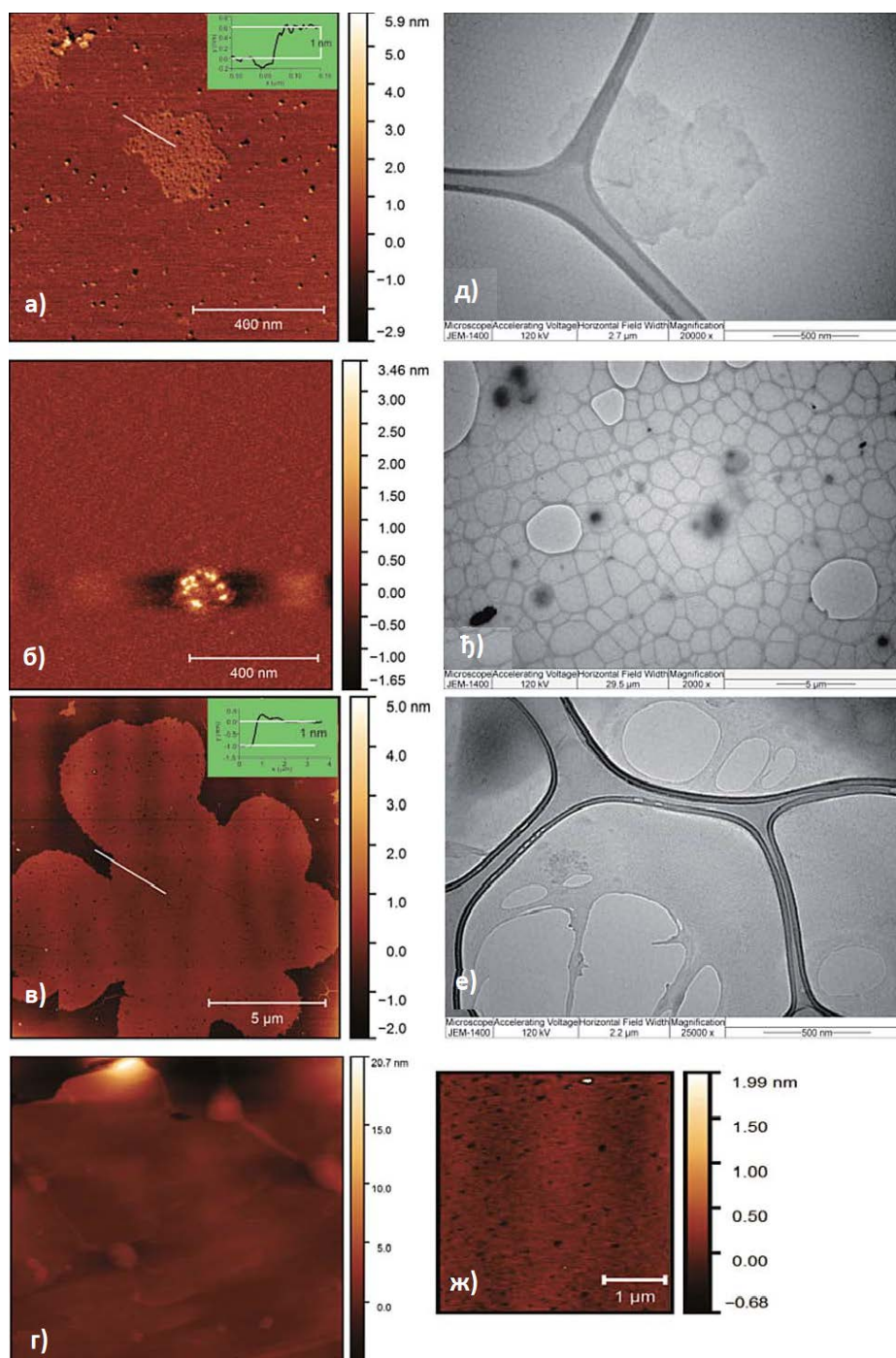
Морфологија површине и микроструктура куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ честица снимљени су помоћу АФМ-а и ТЕМ-а и представљени на сликама 6.1.а-ж). На основу прорачуна изведених Gwyddion-софтвером, просечна латерална димензија ЕНОРГ била је 500 nm, док је просечна дебљина 1 nm, слика 6.1.а). Добијена вредност ЕНОРГ дебљине је нешто већа него код типичног једнослојног графен оксида (0,8 nm) [232], а што је веће и од типичне дебљине графена (~0,36 nm). То је захваљујући присуству бројних везаних кисеоничних функционалних група (карбонил, епокси и хидроксил) са сваке стране, тј. на основној равни и ивицама ексфолираних графенских листића, што значајно доприноси већој вредности дебљине [232,233].

ТЕМ микрофотографија, слика 6.1.д), потврђује да је ЕНОРГ узорак једнослојни графен. На целој површини ЕНОРГ узорка има неколико пора са просечним пречником од 15 nm, слика 6.1.а). Поре су равномерно распоређене на целој површини ексфолираног графена. Поре се јасно виде на површини ексфолираних графенских листића, указујући да су након ексфолијације у 1M раствору APS формиран порозни графенски листићи.

На слици 6.1.б), представљена је типична наночестица куркумина. Она је сферног облика са просечним пречником од 200 nm. Идентичне куркуминске наночестице можемо посматрати ТЕМ-ом, слика 6.1.ђ). На слици 6.1.в), поглед одозго, приказан је АФМ снимак узорка куркумин-ЕНОРГ.

Просечна латерална димензија куркумин функционализованих ексфолираних графенских листића је 5  $\mu\text{m}$ , док је просечна висина око 1 nm, слика 6.1.в). На слици 6.1.г) уочили смо насумице дистрибуиране куркумин наночестице преко ЕНОРГ површине. Куркумин наночестице су везане за неравнине ЕНОРГ површине (оштећене странице). На сликама 6.1.е),ж) запазили смо поре просечних пречника од 150 nm. Функционализација ексфолираних графенских листића са куркумин наночестицама доприноси повећању пречника пора инкорпорираних у ексфолиране графенске листиће.

Просечне вредности храпавости подлоге од ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ узорака су одређене Gwyddion-софтвером и добијене вредности су 0,393 и 1,206 nm. Након функционализације куркумином, храпавост узорка куркумин-ЕНОРГ се повећала три пута.



Слика 6.1. а) AFM профил слике (поглед одозго) и профил висине (уметнуто) на ЕНОРГ узорку; б) AFM куркумин узорка (поглед одозго); в) AFM слика (поглед одозго) и профил висине (уметнуто) куркумин-ЕНОРГ узорка; г) AFM увећане слике (поглед одозго) површине куркумин-ЕНОРГ узорка са насумично распоређеним куркуминским наночестицама; д) TEM микрографија ЕНОРГ узорка; ж) TEM микрографија куркумин узорка; е) TEM слика куркумин-ЕНОРГ узорка и ж) увећана AFM слика пора на површини ЕНОРГ (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [260]).

### 6.1.2. Анализа резултата мерења зета потенцијала узорака

Мерени су зета потенцијали ЕНОРГ, куркумин и куркумин-ЕНОРГ колоида. Вредности зета потенцијала свих узорака су приказани у табели 6.1. Вредности рН водених колоида су подешавани на 7 и 14. Вредности измерених зета потенцијала показали су да су колоиди електростатички стабилизовани и да имају добру стабилност.

Није било знакова коагулације графенских листића ни након више од два месеца. Колоиди свих узорака били су негативно наелектрисани и стабилизовани помоћу електростатичких сила. Вредности зета потенцијала зависили су од рН, што је у складу са чињеницом да је јонизација карбоксилно-киселих група снажно повезана са рН вредностима. Повећањем рН свих колоида, зета потенцијали су били повећани и њихова стабилност је била много боља, осим код куркумин-ЕНОРГ колоида. Код ових колоида вредности зета потенцијала нису мењане. У киселој средини сви колоиди постали су нестабилни.

Табела 6.1. Вредности зета потенцијала куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ узорака

Узорак	Зета потенцијал (mV)	Зета потенцијал (mV)
	рН7	рН14
Куркумин	-45,5±2	-56,0±4
ЕНОРГ	-30,2±1	-41,7±1,5
Куркумин-ЕНОРГ	-41,9±1	-41,6±1,3

### 6.1.3. Анализа ултраљубичасте, видљиве и инфрацрвене спектроскопије узорака

Слика 6.2.а представља UV-Vis спектар ЕНОРГ узорка - криве 1, куркумин узорка - криве 2 и куркумин-ЕНОРГ узорка - криве 3. Што се тиче ЕНОРГ узорка уочавамо један широки врх апсорпције на 270 nm, који потиче од  $\pi$ - $\pi$  прелазу С-С веза. Куркумин спектар показује два апсорпциона опсега: први на 235 nm, који је додељен  $\pi$ - $\pi$  прелазу С-С веза, а други на 422 nm што одговара  $n$ - $\pi^*$  прелазу С=О веза.

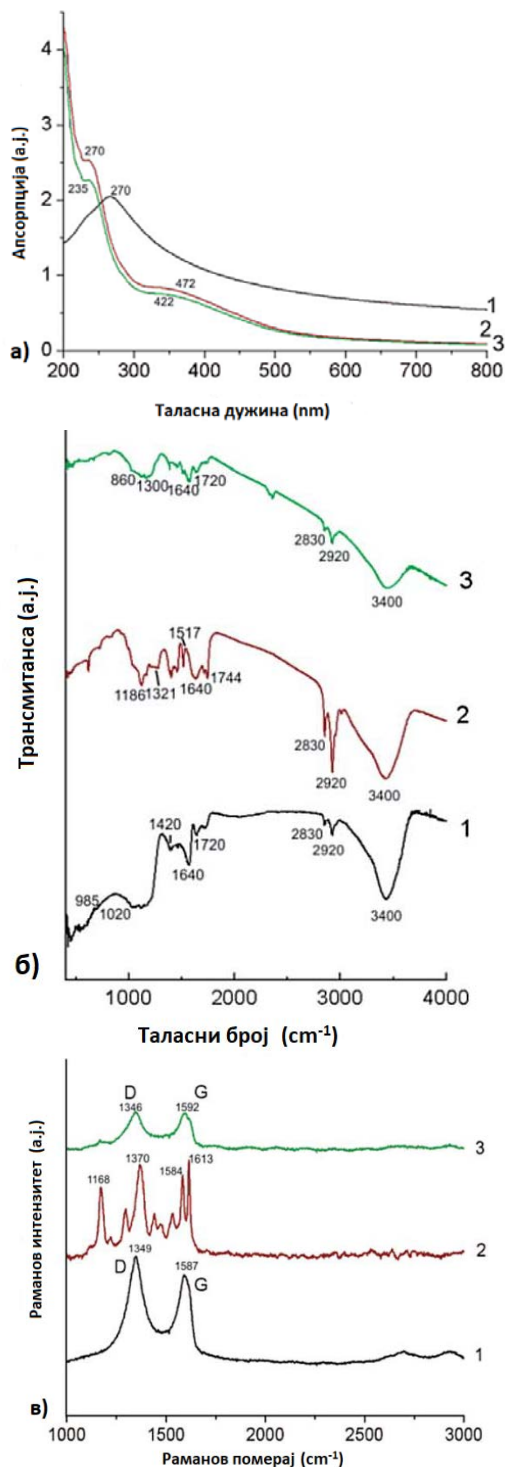
Што се тиче куркумин-ЕНОРГ узорка може се приметити један врх апсорпције на 270 nm - врх померен са 230 nm и он одговара  $\pi$ - $\pi$  прелазу С-С веза, као и један мањи врх на 472 nm који је померен са 422 nm, а који одговара  $n$ - $\pi^*$  прелазу С=О веза. Горњи помераји од 230 до 270 nm указују на редукцију кисеоника ЕНОРГ-а. Према томе, може се закључити да куркумин доприноси смањењу ЕНОРГ-а. Колено на 422 nm је померено на 472 nm и постаје све шире и једва приметно. Ова чињеница може указати на везивање куркумина за површину ЕНОРГ. Спектри FTIR куркумина, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ честица приказани су на слици 6.2.б. FTIR спектри свих узорака показују један широк врх на 3400  $\text{cm}^{-1}$ , који произилази из О-Н вибрација и два мала врха на 2830 и 2920  $\text{cm}^{-1}$ , који произилазе из С-Н вибрација истезања.

Што се тиче ЕНОРГ узорка, врх на 2170  $\text{cm}^{-1}$  указује на вибрације скелета од неоксидизованих домена графита. Врх на 1720  $\text{cm}^{-1}$  указује на присуство С=О вибрација док врхови на 1420 и 1050  $\text{cm}^{-1}$  проистичу из С-О вибрација истезања. Врх на 1640  $\text{cm}^{-1}$  произилази из комбинације С=С и С=О вибрација, док врхови на 985 и 1020  $\text{cm}^{-1}$  проистичу од уметнутих сулфатних јона.

Код узорка куркумина, идентификовали смо неколико врхова који произилазе из карбонилних група (1744, 1714, 1640, 1517  $\text{cm}^{-1}$ ), док у опсегу од 1321 до 1186  $\text{cm}^{-1}$  проистичу од  $\text{CH}_3$  вибрација. Врх на 1120  $\text{cm}^{-1}$  потиче од О- $\text{CH}_3$  вибрација, док врхови на 2830 и 2920  $\text{cm}^{-1}$  проистичу из С-Н вибрација који се јављају у куркумин FTIR спектру због присуства етанола. Код куркумин-ЕНОРГ узорка постоје преклапања неких опсега између 860 и 1780  $\text{cm}^{-1}$ . На опсегу 860-1300  $\text{cm}^{-1}$  вибрације потичу од мешања вибрација сулфата јона и  $\text{CH}_3$  и вибрација О- $\text{CH}_3$ , где су врхови на 1640 и 1720  $\text{cm}^{-1}$  проистекли из С=О вибрација.

### 6.1.4. Анализа раманове спектроскопије узорака

На слици 6.2.в) представљени су Раманови спектри ЕНОРГ (крива 1), куркумина (крива 2) и куркумин-ЕНОРГ (крива 3). Раманови спектри свих узорака су нормализовани на врх G траке (ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ) и највишег врха интензитета узорка куркумина. Раманови спектри ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ су фитовани са две Лоренцове криве, а резултати фитовања су дати у табели 6.2.



Слика 6.2. а) UV-Vis спектри: узорак ЕНОРГ - крива 1; узорак куркумина - крива 2; узорак куркумин-ЕНОРГ - крива 3; б) FTIR спектри: узорак ЕНОРГ - крива 1; узорак куркумина - крива 2; узорак куркумин-ЕНОРГ - крива 3; в) Раманови спектри: узорак ЕНОРГ - крива 1; узорак куркумина - крива 2; узорак куркумин-ЕНОРГ - крива 3 (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [260]).

Табела 6.2. Положај D и G трака, као и FWHM од ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ узорака.

Узорак	D трака (cm <sup>-1</sup> )	G трака (cm <sup>-1</sup> )	FWHM (cm <sup>-1</sup> )
ЕНОРГ	1349,4	1586,6	61,65
Куркумин-ЕНОРГ	1346,1	1591,9	62,01

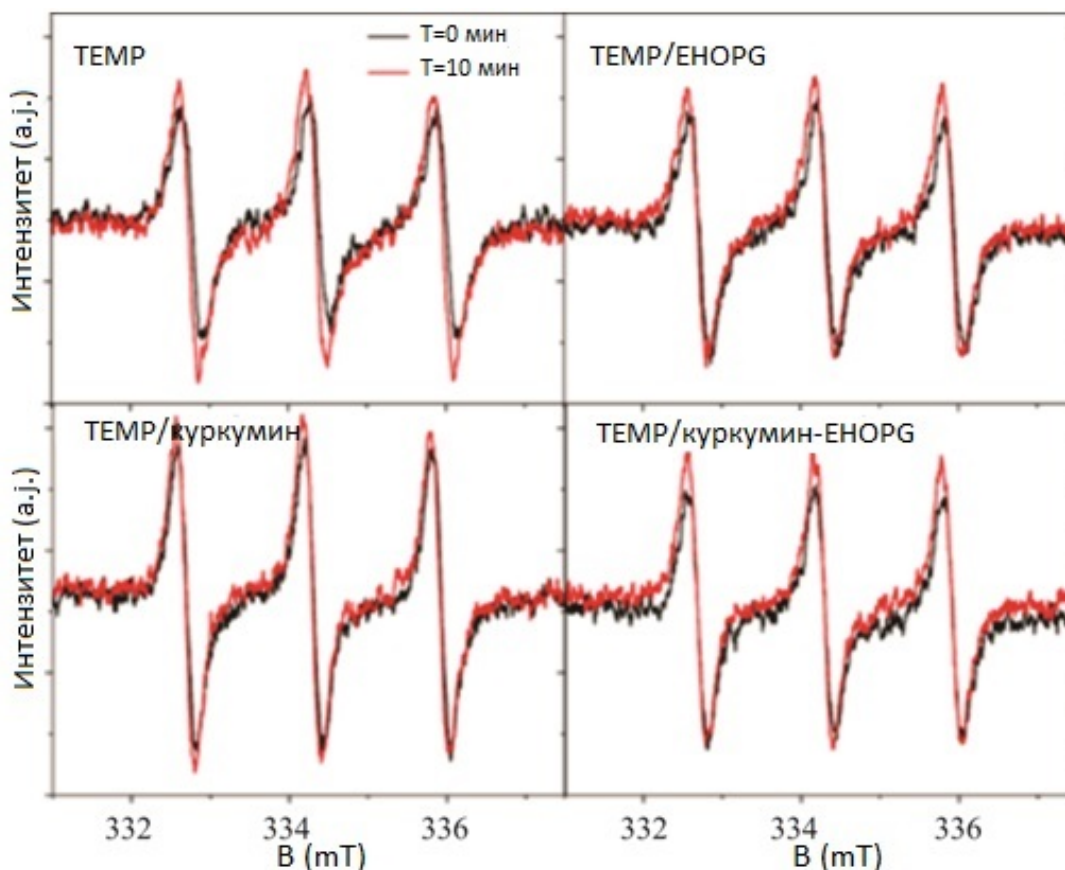
На основу података представљених у табели 6.2, закључили смо следеће: G трака ЕНОРГ-а се помера надесно за 6,6 cm<sup>-1</sup> због интеркалације јона сулфата током процеса ексфолијације. Након функционализације ЕНОРГ куркумином, G трака је додатно померена надесно за 5,3 cm<sup>-1</sup>. Овај померај указује на то да постоји трансфер наелектрисања између ЕНОРГ и куркумина и да ЕНОРГ даје своје електроне куркумину. Стога је ЕНОРГ ковалентно функционализован помоћу куркумина. Овај резултат је у корелацији са мерењима зета потенцијала која су показала дуготрајну хемијску стабилност ових колоида.

### 6.1.5. Анализа електронске парамагнетне резонантне спектроскопије узорака

EPR спектроскопијом испитивана је способност куркумин, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ узорака да прозведу реактивне кисеонике, који садрже функционалне групе: <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, хидроксил (HO•) и супероксид радикал (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>).

Производња синглетног кисеоника проучаваних дисперзија била је анализирана помоћу селективног трап молекула 2,2,6,6-тетраметилпиперидина (ТЕМР), слика 6.3. Техника се заснива на реакцији између ТЕМР и синглетног кисеоника која доводи до формирања стабилног EPR активног једињења, 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила (ТЕМРО). Производња једног кисеоника у узорку мерена је пре и после фотоексцитације. Контролна мерења ТЕМР раствора пре и после експозиције светлости показују мали сигнал ТЕМРО. Након додавања узорака, нису постојале значајне промене у интензитету сигнала карактеристичног за ТЕМРО. Чак и после 10 минута излагања светлости ТЕМРО сигнал није увећан. Ови резултати указују на то да испитивани узорци не производе синглетни кисеоник. Према томе, продужена UV фотоексцитација није узроковала промене у производњи синглетног кисеоника.

Што се тиче производње хидроксилних и супероксидних радикала, коришћен је DMPO као молекула спинске клопке. Прво су измерени интензитети сигнала од DMPO са и без излагања светлости и примећено је да нема значајних EPR сигнала. Међутим, са Фентоновом реакцијом, примећени су врло јаки EPR сигнали.

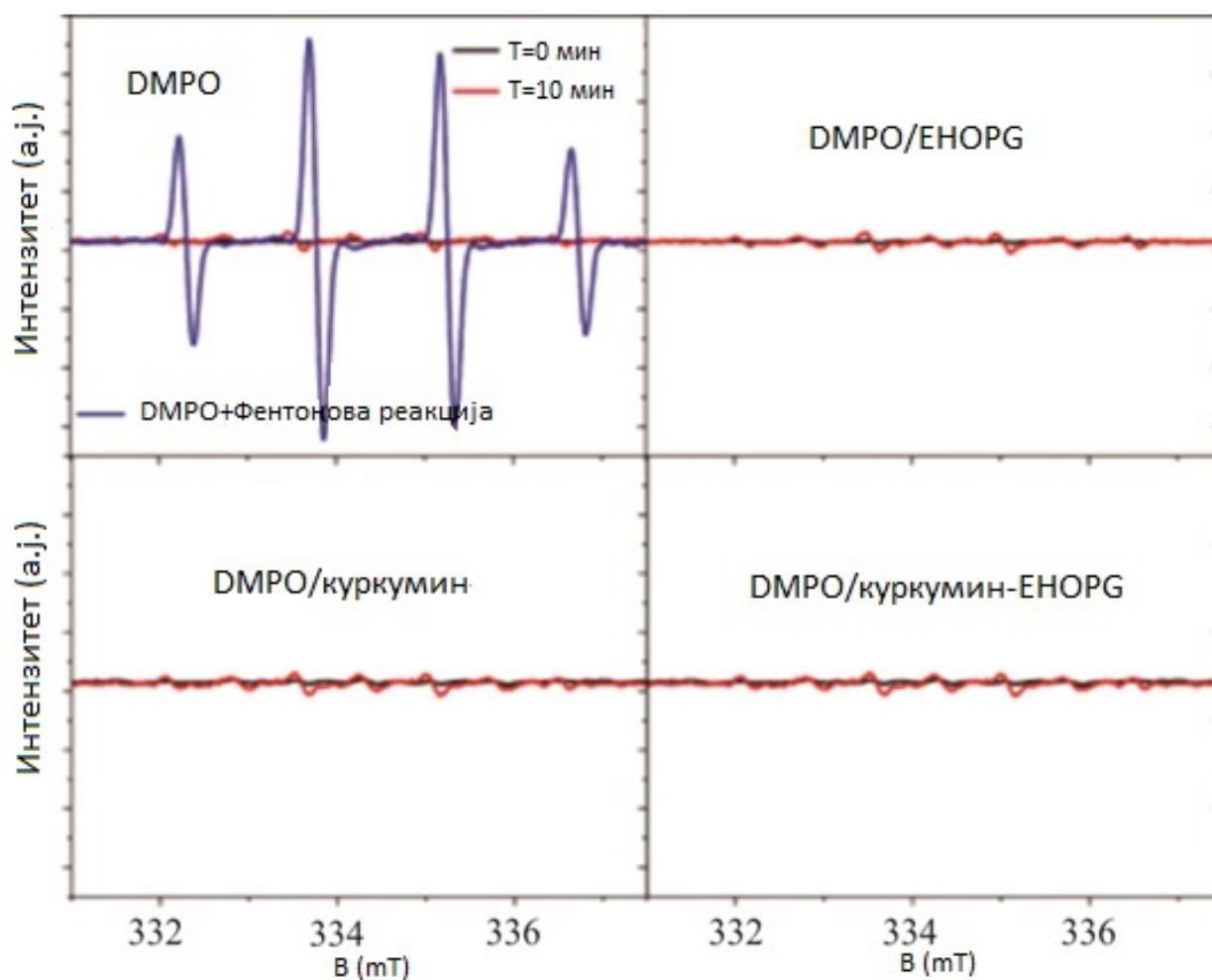


Слика 6.3. EPR спектри TEMP раствора у мрачним условима ( $T=0$  минута, црна линија) и након 10 минута изложености UV светлости ( $T=10$ , црвена крива), TEMP помешан са EHPG, куркумин и куркумин-EHPG на  $T=0$  и 10 минута (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [260]).

EPR мерења узорка помешаних са DMPO није показала никакве разлике у поређењу са EPR спектром чистог DMPO (слика 6.4). Чак и након експозиције светлости, производња хидроксилних и супероксидних радикала није била детектована. Ови резултати указују на то да у условима ових истраживања анализирани узорци не могу произвести радикале који садрже кисеоник.

Постоје публиковани радови о производњи синглетног кисеоника и супероксида од куркумина [234,235]. Куркумин је производио синглетни кисеоник након зрачења (таласна дужина већа од 400 nm) у толуену или ацетонитрилу. У ацетонитрилу куркумин је поред стварања и неутралисао  $^1\text{O}_2$ . У таквом случају, деградација куркумина након фотоекситације се мора процесуирати упркос триплетном побуђеном стању куркумина [236]. Фото-физичке студије су показале да је време живота троструко побуђеног стања куркумина реда микросекунди, што сугерише да се деградација мора одиграти веома брзо у поређењу са формирањем синглетног кисеоника. EPR мерења синглетног кисеоника и супероксида показала су да узорци EHPG, куркумин и куркумин-EHPG не производе реактивне кисеоничне радикале (ROS) под било каквим условима.





Слика 6.4. EPR спектри раствора DMPO у мрачним условима ( $T=0$ , црна линија), после 10 часова излагања UV светлости ( $T=10$ , црвена крива), са Фентономом реакцијом (плава крива), DMPO помешан са ЕНОРG, куркумин и куркумин-ЕНОРG на  $T=0$  и 10 минута (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [260]).

### 6.1.6. Анализа антибактеријских активности

Испитивани су ефекти куркумина, ЕНОРG-а и куркумин-ЕНОРG-а на раст *E. coli* и *S. aureus* бактерија. Криве раста бактерија третираних различитим концентрацијама куркумина (0,125 - 2 mg/ml), ЕНОРG-а (0,125 - 0,5 mg/ml) и куркумин-ЕНОРG-а (0,125 - 1 mg/ml), мерене су преко вредности оптичке апсорпције на 630 nm  $OD_{630}$  као што је приказано на сликама 6.5.а-ђ). Због присуства материјала који може утицати на интерпретацију података, оптичка густина бактеријских култура била је коригована за  $OD_{630}$  стерилног медијума у коме расту бактерије, са куркумином, ЕНОРG-ом и куркумин-ЕНОРG-ом, респективно. У обзир су узети узорци код којих је примећена промена боје медијума или преципитација (таложење бактерија и графена на дно епрувете) на крају инкубације.

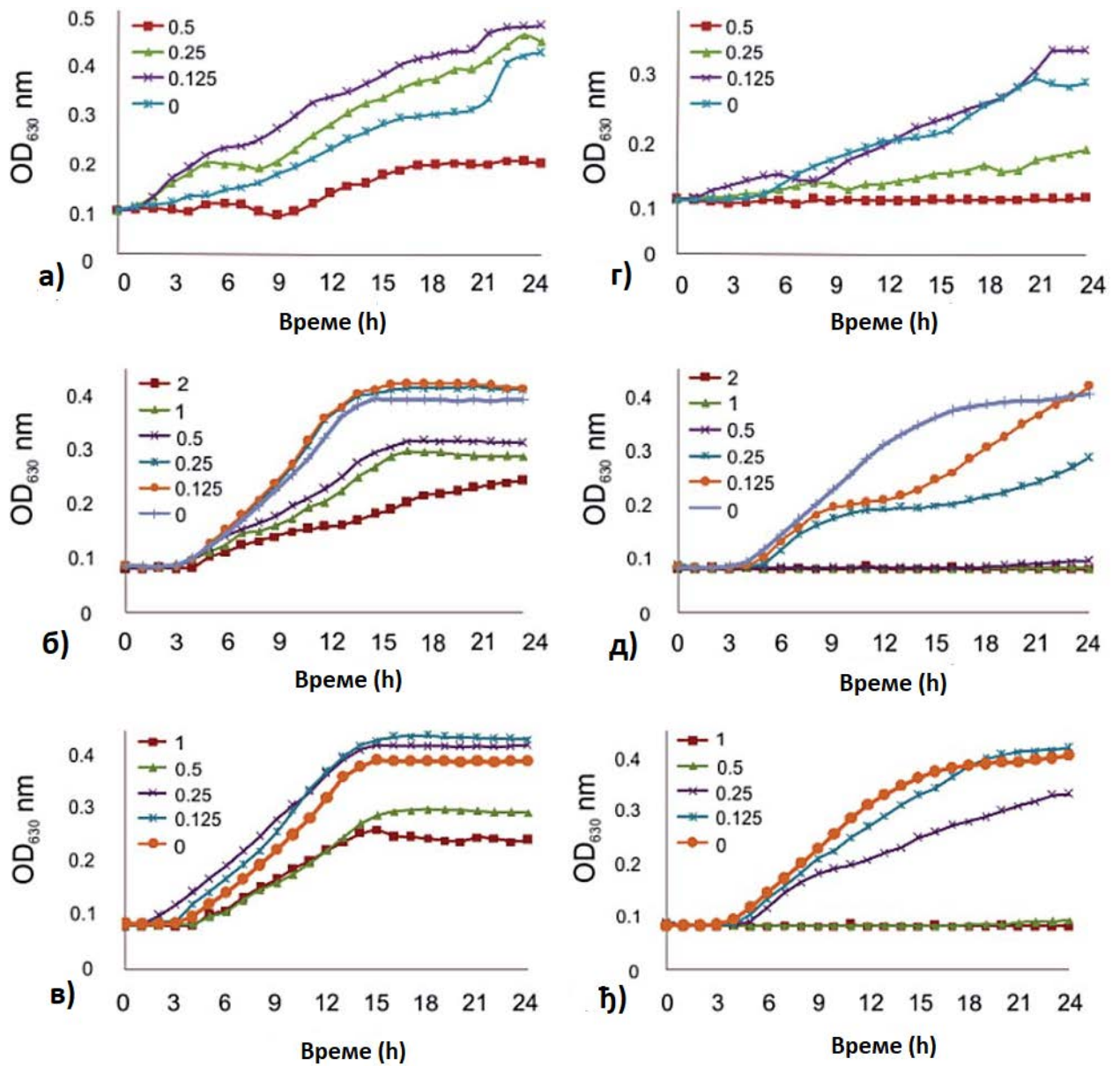
Резултати мерења  $OD_{630}$  показали су да су ћелије *E. coli* могле да расту у присуству примењених концентрација узорака, слике 6.5.а-в). При концентрацијама куркумина у распону од 0,5 до 2 mg/ml откривене су ниже вредности  $OD_{630}$  у поређењу са контролним, а исти резултати су били добијени са 0,5 mg/ml ЕНОРG-а и са 0,5 и 1 mg/ml куркумин-ЕНОРG-а. Ниже концентрације узорака (куркумин, ЕНОРG и куркумин-ЕНОРG) нису утицале на раст *E. coli* која је била у стању да достигне исти крајњи  $OD_{630}$  као и нетретиране ћелије.



У случају *S. aureus* бактерије која је третирана са ЕНОРГ-ом, слика 6.5.г), бактеријска фаза раста није детектована када је коришћена концентрација 0,5 mg/ml. Концентрација 0,25 mg/ml ЕНОРГ-а индуковала је продужену успорену (закаслелу) фазу, а постигнута вредност OD<sub>630</sub> износила је пола максимума. *S. aureus* ћелије изложене 0,125 mg/ml ЕНОРГ-а успеле су да расту несметано. Када су концентрације куркумина биле у распону од 0,5 до 2 mg/ml, није детектован раст *S. aureus*-а у року од 24 часа, слика 6.5.д). Третман са 0,25 mg/ml куркумином резултирао је нижим коначним вредностима OD<sub>630</sub>, док су код 0,125 mg/ml *S. aureus* ћелије могле да расту несметано. Слични резултати су добијени када су *S. aureus* ћелије третиране куркумин-ЕНОРГ-ом, слика 6.5.ђ). Концентрације 0,5 и 1 mg/ml су деловале инхибиторно, док је 0,25 mg/ml куркумин-ЕНОРГ-а снижавао коначне OD<sub>630</sub> вредности. На најнижој тестираној концентрацији (0,125 mg/ml) куркумин-ЕНОРГ-а криве раста ишле су паралелно са кривама позитивне контроле достижући исти крајњи OD<sub>630</sub>.

Пошто је укупан број бактерија, укључујући живе и изумрле бактерије, тестиран са OD<sub>630</sub>, фаза опадања није могла бити откривена на кривама раста. Такође, с обзиром на потешкоће у тумачењу резултата због таложења материјала, коришћен је алтернативни тест преживљавања. Као што је приказано у табели 6.3, ћелије *E. coli* су могле расти у присуству куркумина, ЕНОРГ-а и куркумин-ЕНОРГ-а у концентрацијама од 2 mg/ml, 0,5 mg/ml и 1 mg/ml, респективно, али фаза опадања је почела раније у поређењу са контролом.

Третман *S. aureus* са 2 mg/ml куркумина резултирао је приближно 1 log<sub>10</sub> редукијом током првих 6 часова, а после 9 часова утврђен је бактерицидни ефекат. Концентрација 1 mg/ml куркумина и куркумин-ЕНОРГ-а је забележена као минимална инхибиторна концентрација (МИС), јер је након 24 часа инкубације примећено значајно смањење (> 90%) у преживљавању инокулума. У концентрацији од 0,5 mg/ml куркумина, ЕНОРГ-а и куркумин-ЕНОРГ-а, примећена је бактериостатска активност и након 24 часа, при чему није било значајне разлике између узорака ( $\alpha \leq 0,05$ ).



Слика 6.5. Оптичка густина тестиране културе у медијуму коме је додат: а) ЕНОРГ у концентрацији 0-0,5 mg/ml - *E. coli*, б) куркумином у концентрацији од 0-2 mg/ml - *E. coli*, в) куркумин-ЕНОРГ-ом у концентрацији 0-1 mg/ml - *E. coli*, г) ЕНОРГ-ом у концентрацији 0-0,5 mg/ml - *S. aureus*, д) куркумином у концентрацији 0-2 mg/ml - *S. aureus*, е) куркумин-ЕНОРГ-ом у концентрацији 0-2 mg/ml - *S. aureus* (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [260]).

Табела 6.3. Антибактеријска активност куркумина, ЕНОРГ-а и куркумин-ЕНОРГ-а одређена методом макро разблаживања и изражена као  $\log_{10}$  CFU ml<sup>-1</sup>.

* $\log_{10}$ CFU mL <sup>-1</sup>	0 h	3 h	6 h	9 h	24 h
Бактеријска концентрација					
<b>ЕСС</b>	<b>5.3 ± 0.3<sup>а1</sup></b>	<b>7.0 ± 0.5<sup>а</sup></b>	<b>8.6 ± 0.3<sup>а</sup></b>	<b>8.7 ± 0.3<sup>а</sup></b>	<b>9.9 ± 0.6<sup>а</sup></b>
ЕССУ (2 mg mL <sup>-1</sup> )	5.2 ± 0.2 <sup>а</sup>	6.4 ± 0.2 <sup>а</sup>	7.7 ± 0.3 <sup>б</sup>	8.2 ± 0.1 <sup>аб</sup>	7.3 ± 0.2 <sup>б</sup>
ЕСЕНОРГ (0.5 mg mL <sup>-1</sup> )	5.4 ± 0.3 <sup>а</sup>	6.3 ± 0.1 <sup>а</sup>	7.7 ± 0.2 <sup>б</sup>	8.0 ± 0.2 <sup>б</sup>	7.2 ± 0.2 <sup>б</sup>
ЕССУЕНОРГ (1 mg mL <sup>-1</sup> )	5.3 ± 0.2 <sup>а</sup>	6.3 ± 0.1 <sup>а</sup>	7.8 ± 0.2 <sup>б</sup>	8.5 ± 0.2 <sup>аб</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>б</sup>
<b>САС</b>	<b>5.1 ± 0.2<sup>а</sup></b>	<b>6.5 ± 0.2<sup>а</sup></b>	<b>7.2 ± 0.4<sup>а</sup></b>	<b>8.5 ± 0.4<sup>а</sup></b>	<b>8.8 ± 0.3<sup>а</sup></b>
САСУ (2 mg mL <sup>-1</sup> )	4.8 ± 0.3 <sup>а</sup>	4.3 ± 0.1 <sup>с</sup>	2.9 ± 0.2 <sup>е</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>г</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>е</sup>
САСУ (1 mg mL <sup>-1</sup> )	5.0 ± 0.1 <sup>а</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>с</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>д</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>ф</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>д</sup>
САСУ (0.5 mg mL <sup>-1</sup> )	5.0 ± 0.1 <sup>а</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>с</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>с</sup>	5.6 ± 0.2 <sup>д</sup>	6.1 ± 0.3 <sup>с</sup>
САСУ (0.25 mg mL <sup>-1</sup> )	5.1 ± 0.2 <sup>а</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>б</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>б</sup>	6.5 ± 0.3 <sup>с</sup>	8.0 ± 0.2 <sup>б</sup>
САЕНОРГ (0.5 mg mL <sup>-1</sup> )	4.9 ± 0.2 <sup>а</sup>	5.4 ± 0.2 <sup>б</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>с</sup>	5.4 ± 0.2 <sup>д</sup>	5.7 ± 0.3 <sup>с</sup>
САСУЕНОРГ (1 mg mL <sup>-1</sup> )	5.2 ± 0.3 <sup>а</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>с</sup>	4.8 ± 0.2 <sup>сд</sup>	4.7 ± 0.2 <sup>е</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>д</sup>
САСУЕНОРГ (0.5 mg mL <sup>-1</sup> )	4.9 ± 0.2 <sup>а</sup>	5.0 ± 0.1 <sup>б</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>с</sup>	6.0 ± 0.2 <sup>сд</sup>	6.0 ± 0.2 <sup>с</sup>
САСУЕНОРГ (0.25mg mL <sup>-1</sup> )	5.0 ± 0.1 <sup>а</sup>	5.1 ± 0.2 <sup>б</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>б</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>б</sup>	8.8 ± 0.4 <sup>а</sup>

С - Контрола,  $\log_{10}$  CFU ml<sup>-1</sup> без куркумин-а, ЕНОРГ-а и куркумин-ЕНОРГ-а.

\*Подаци су изражени као средња ± трострука стандардна девијација

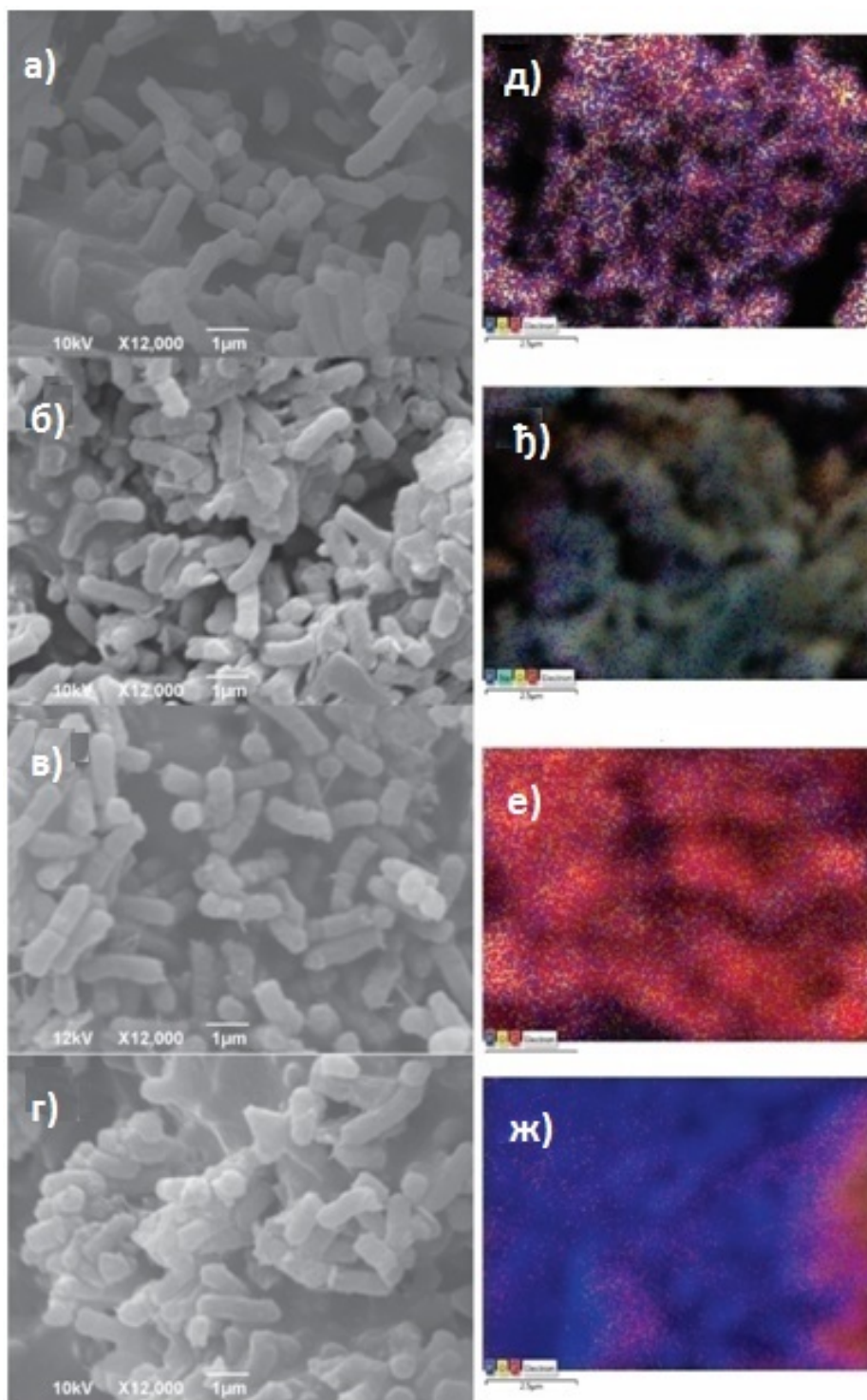
<sup>1</sup>Унутар исте колоне, средње вредности праћене различитим словима битно су различите при  $\alpha \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey's HSD test).

### 6.1.7. Морфологија бактеријских врста

Слике 6.6.а-г) представљају површинску морфологију ЕСС, ЕСЕНОРГ, ЕССУ, ЕССУЕНОРГ узорака, док слике 6.6.д-ж) представљају њихове одговарајуће EDS спектре. Како се може видети са слике 6.6.а), просечне дужине *E. coli* сојева су 2  $\mu$ m. На слици 6.6.б), након интеракције са ЕНОРГ-ом може се видети веома мало оштећење на бактеријској мембрани. Сличне промене се могу видети на сликама 6.6.в),г), где су приказане интеракције *E. coli* са куркумином и куркумин-ЕНОРГ-ом.

EDS дистрибуција елемената С, О, На и Р на нетретираној бактеријској мембрани показала је њихову хомогену дистрибуцију, слика 6.6.д). Након интеракције са куркумином, ЕНОРГ и куркумин-ЕНОРГ-ом, дистрибуције одређених елемената су промењене. Квалитативна EDS анализа ЕСС, ЕСЕНОРГ, ЕССУ и ЕССУЕНОРГ-а представљена у табели 6.4 показала је да се садржај С врло мало променио, док је садржај О три и пет пута већи за ЕСЕНОРГ и ЕССУ, респективно. За ЕССУЕНОРГ узорак садржај О је благо смањен, а садржај Р је 2,3 пута већи у односу на ЕСС.

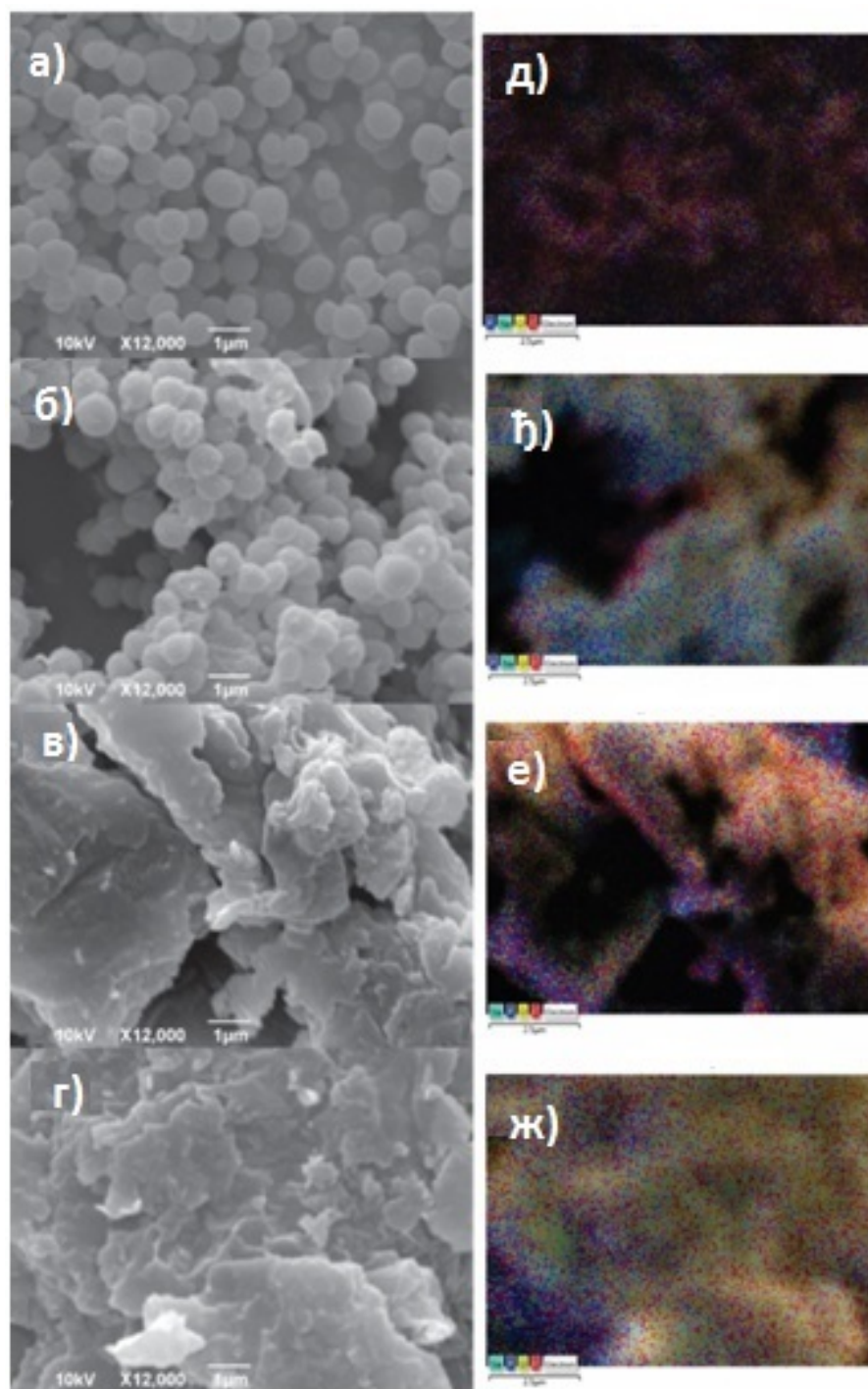
На слици 6.6.ђ) може се посматрати неуједначена расподела Р, док слика 6.6.е) представља униформну расподелу С и Р. Слика 6.6.ж) означава равномерну расподелу Р. На овој слици може се приметити детекција Р на целој посматраној површини, чак и у подручјима где се бактеријски сојеви не могу приметити. Ова чињеница указује на могуће оштећење бактеријске мембране.



Слика 6.6. SEM микрографије а) ECC, б) ЕСЕНОРГ, в) ECCU, г) узорци ECCUEНОРГ и одговарајућа EDS расподела откривених елемената у скенираној области узорка (д-ж) (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф.[260]).

Слике 6.7.а-г) представљају SEM микрографије површинске морфологије SAC, SAЕНОРГ, SACU и SACUEНОРГ узорака, док слике 6.7.д-ж) представљају одговарајуће EDS дистрибуције елемената детектованих на мембранама бактерије. Као што се види са слике 6.7.а) просечан пречник *S. aureus*-а је 500 nm. На слици 6.7.б) се виде веома мале промене на бактеријским мембранама након интеракције са ЕНОРГ-ом.

На сликама 6.7.в),г) не можемо посматрати било какве врсте (сојеве) бактерија. EDS расподела откривених елемената је хомогена само на нетретираним *S. aureus*-има, слика 6.7.д), док неке промене постоје у расподели елемената у сојевима бактерија које су третиране (слике 6.7.ђ-ж)).



Слика 6.7. SEM микрографије а) SAC, б) SAEHOPG, в) SACU, г) SACUEHOPG узорака и одговарајућа EDS расподела откривених елемената у скенираној области узорка (д-ж) (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф.[260]).



Садржај С био је повећан након интеракције *S. aureus*-а са свим узорцима, док се при истим интеракцијама садржај О скоро двоструко смањено. Р се није могао детектовати у скенираним областима на SACU и SACUEHOPG. Комплетно одсуство Р на бактеријским мембранама после интеракција са куркумином и куркумин-ЕНОРГ-ом може указати на оштећење мембрана.

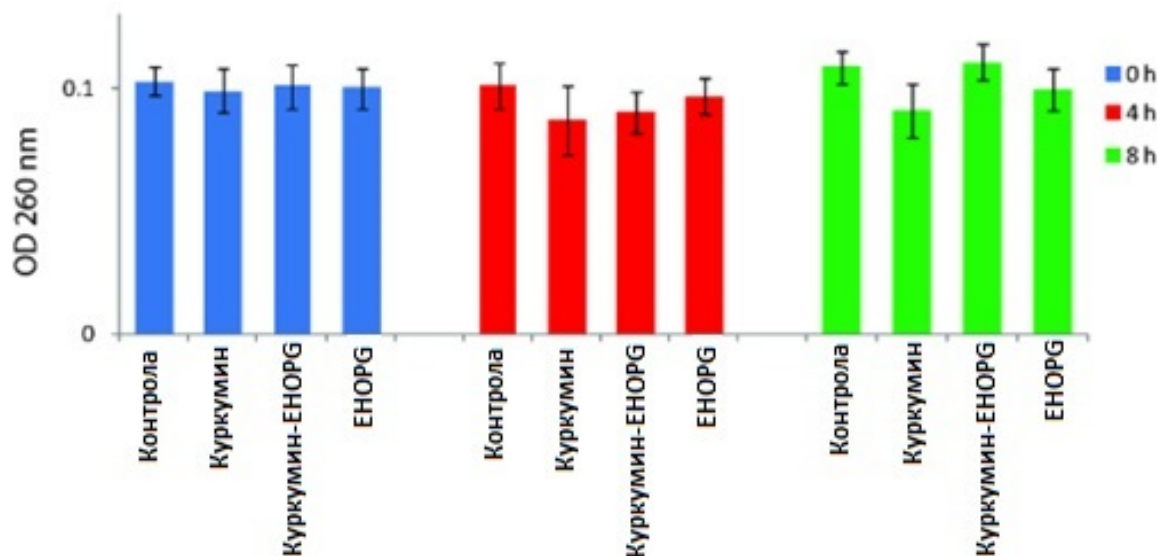
Табела 6.4 приказује промене садржаја детектованих елемената на бактеријској мембрани.

Табела 6.4. EDS расподела детектованих елемената у скенираној области узорка у Wt%.

Узорак	С	Р	Na	О
ECC	97.11	0.63	-	2.25
ECEHOPG	92.41	-	1.30	6.29
ECCU	88.12	0.83	-	11.05
ECCUEHOPG	96.54	1.47	0.15	1.84
SAC	82.45	2.88	2.47	12.20
SAEHOPG	90.37	1.79	2.27	5.58
SACU	94.42	-	0.12	5.46
SACUEHOPG	94.38	-	0.07	5.55

### 6.1.8. Губитак материјала који апсорбује светлост на 260 nm

Присуство материјала у ћелијски слободном медијуму (у коме нема бактерија) који се апсорбује на 260 nm указује на то да су велики молекули (нпр. нуклеинске киселине) изашли из унутрашњости ћелије и да је дошло до оштећења мембрана бактерије. Вредности OD<sub>260s</sub> филтрата из *S. aureus*-а контролних суспензија остале су приближно исте након 4 часа, као и после 8 часова. OD<sub>260s</sub> филтрата из *S. aureus*-а суспензија третираних са 1 mg/ml, 0,5 mg/ml и 1 mg/ml куркумина, ЕНОРГ-а и куркумин-ЕНОРГ-а, такође су остали скоро исти током целог периода тестирања (слика 6.8).

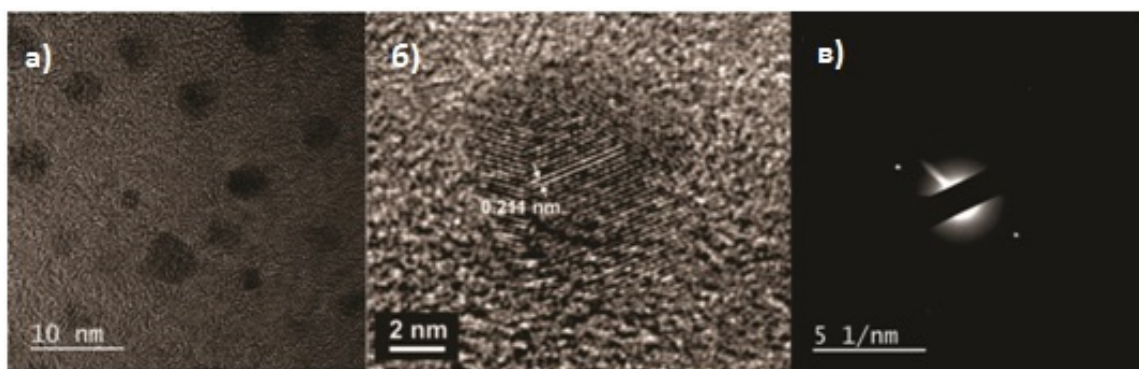


Слика 6.8. Присуство 260 nm апсорбујућег материјала у филтратима *S. aureus*-а након третмана са куркумином, куркумин-ЕНОРГ и ЕНОРГ-ом 4 и 8 часова, у односу на контролну *S. aureus* суспензију. Приказана је Средња вредност  $\pm$  SD (стандардна девијација) за три понављања (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [260]).

## 6.2. Лангмир-Блоцет танки слојеви хидрофобних угљеничних квантних тачака

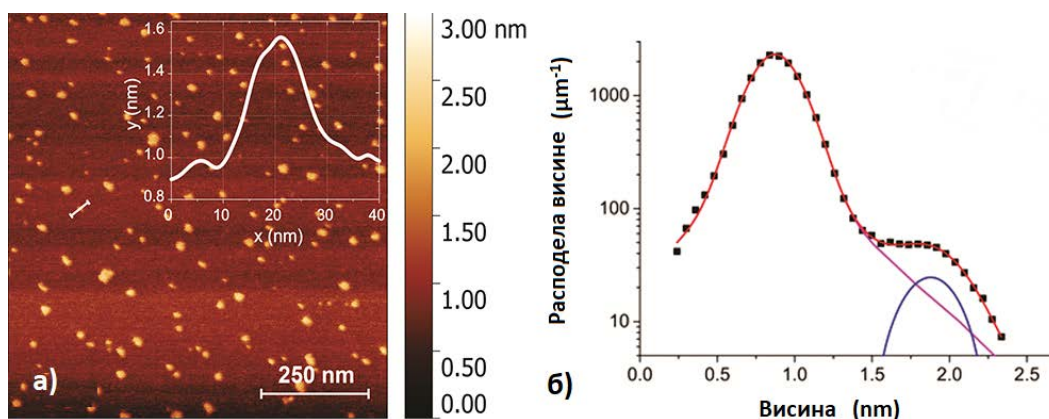
ТЕМ и АФМ смо користили за визуелно представљање облика и висине hУКТ, као и за одређивање њихових средњих пречника. Слика 6.9.а) приказује ТЕМ микрографију hУКТ наночестица на аморфној угљеничној фолији. hУКТ имају форму сфероидног облика са просечним пречником од 5 nm на дужој оси, што је одређено статистичком анализом више од 20 микрографава.

Анализа HRTEM и SAED узорка појединачних hУКТ-а открила је њихову поликристалну структуру са непоремећеном графитном решетком, слике 6.9.б),в). На слици 6.9.б) приказана је увећана hУКТ наночестица. Измерено растојање (100) равни од 0,211 nm даје параметар решетке  $a = 0,211 \text{ nm}$  (просторна група:  $R\bar{3}m$ ), која је близу параметру решетке  $a = 0,244 \text{ nm}$  графита [237].



Слика 6.9. а) ТЕМ микрографија hУКТ, б) HRTEM микрографија одабраних hУКТ наночестица са поликристалном структуром и в) SAED hУКТ-а (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф.[261]).

АФМ слика hУКТ на подлози од лискуна дата је на слици 6.10.а). Уметак на слици 6.10.а) приказује скенирање линије висине преко појединачних hУКТ. hУКТ висина дуж краће осе била је одређена и износила је  $1 \pm 0,3 \text{ nm}$ , слика 6.10.б). Средња вредност пречника hУКТ-а који су детерминисани помоћу АФМ слика била је 20 nm. Ова вредност указала је на благу агломерацију (нагомилавање) hУКТ-а у поређењу са вредношћу која је добијена ТЕМ анализом.

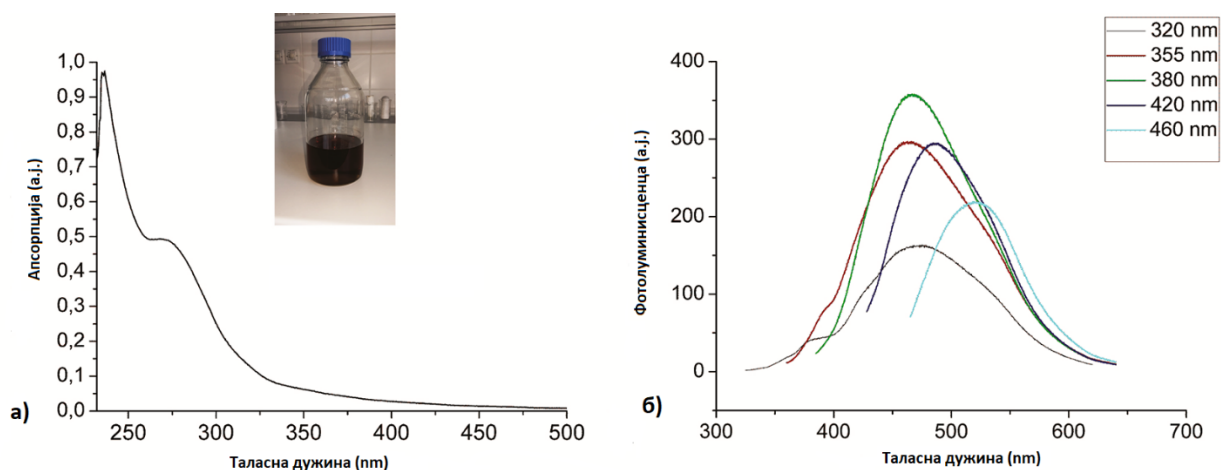


Слика 6.10. а) АФМ слика hУКТ (поглед одозго), уметак приказује профил висине једне hУКТ, б) хистограм расподеле висине hУКТ депонованих на подлози од лискуна (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).



На слици 6.11.а) приказан је UV-Vis спектар апсорпције hUKT наночестица диспергованих у хлороформу. Максимални апсорпциони врх на 271 nm је  $\pi$ -плазмонска екситација [238] уобичајена за графитне структуре, што је потврђено посматрањем графитне решетке у hUKT коришћењем HRTEM-а, слика 6.11.б). На уметку слике 6.11.а) приказана је оптичка слика колоидног раствора hUKT у хлороформу.

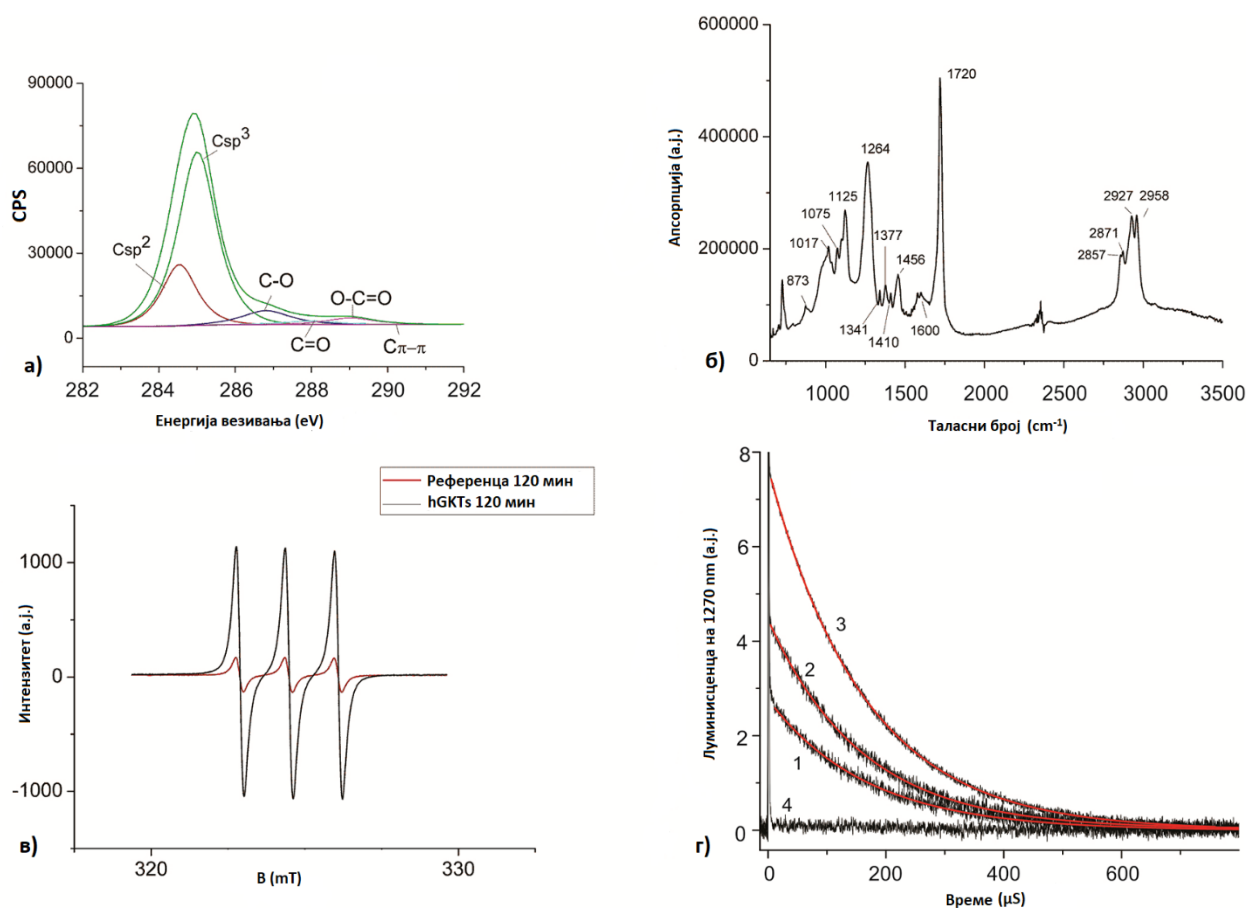
На слици 6.11.б) показано је да hUKT има снажну фотолуминесценцу на различитим таласним дужинама побуде. Највиши интензитет PL добијен је на таласној дужини екситације 380 nm са максималном емисијом од 467 nm. Стоксов померај hUKT диспергованих у хлороформу је 87 nm. Ове hUKT емитују плаво-зелено светло у зависности од таласне дужине побуде.



Слика 6.11. а) UV-Vis спектри hUKT диспергованих у хлороформу, б) PL hUKT диспергованих у хлороформу (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

На основу више публикованих радова закључено је да снажна фотолуминесценца hUKT-а потиче од зрачења које настаје услед рекомбинације парова електрон-шупљина у локализованим електронским стањима  $sp^2$  домена, као и цик-цак ефекта [239,240]. Поред ових механизма, површински дефекти или функционалне групе кисеоника које се налазе дуж ивица и на базалним равнима hUKT-а могу изазвати црвени померај (померање максимума ка већим таласним дужинама) емисије фотолуминесценце [241]. "Површинска стања" на hUKT, са енергетским нивоима између  $\pi$  и  $\pi^*$  стања C=C веза, формирана су овим функционалним групама. Поред тога, зрачење због рекомбинације заробљених екситона доприноси црвеном померању емисије фотолуминесценце.

На слици 6.12.а) приказан је XPS спектар LB hUKT слоја депонованог на SiO<sub>2</sub>/Si подлогу. Хемијска померања нивоа C 1s језгра јасно показују различите хемијске везе по површини и на ивицама hUKT.



Слика 6.12. а) XPS спектар hUKT, б) FTIR спектар hUKT, в) EPR спектри синглетног кисеоника који је произвео LB танки слој hUKT и референтни узорак г) Упоредивање луминесценце синглетног кисеоника на 1270 nm након ласерске побуде hUKT-а - крива 1, тетрафенилпорфирин-а - крива 2, фулерена C<sub>60</sub> у ваздуху засићеним хлороформом - крива 3 и hUKT у аргону са засићеним хлороформом - крива 4. Сви узорци су прилагођени истој апсорпцији ( $A = 0,155 \pm 0,002$ ) на таласној дужини ексцитације од 425 nm. Црвене линије су једнократна експоненцијална фитовања у експерименталне податке (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

Слика 6.12.б) приказује FTIR спектар LB hUKT танких слојева депонованих на SiO<sub>2</sub>/Si подлогу. Као што се може приметити на овој слици, врхови на 2857, 2871, 2927 и 2958 cm<sup>-1</sup> припадају вибрацијама услед растезања C-H везе [242,243]. Максимум на 1720 cm<sup>-1</sup> потиче од C=O група, док максимуми на 1410, 1577, 1600 cm<sup>-1</sup> показују C=C вибрације [244]. Сигнали на 1017, 1075, 1125 и 1456 cm<sup>-1</sup> потичу од C-O везе [242,244] док врхови на 873 и 1377 cm<sup>-1</sup> указују на C-H вибрације услед торзије [242,245,246].

Фотогенерисање синглетног кисеоника потврђено је коришћењем две независне методе базиране на EPR спектроскопији и луминесценци синглетног кисеоника. На слици 6.12.в) приказан је EPR спектар TEMP/воденог раствора озраченог плавом светлошћу, који је накапан на LB hUKT танке слојеве депоноване на SiO<sub>2</sub>/Si подлогу. За референцу коришћен је TEMP/водени раствор. За детекцију производње синглетног кисеоника hUKT коришћен је селективни трап агент TEMP [137]. Због стабилне реакције између TEMP и синглетног кисеоника формирано је EPR активно једињење, 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (TEMPO).

Производња синглетног кисеоника у узорку праћена је пре и после фотоексцитације на таласној дужини од 470 nm. Као што се види са слике 6.12.в), hUKT генеришу синглетни кисеоник при зрачењу плавом светлошћу (време зрачења 120 минута). Без зрачења није било генерисања синглетног кисеоника. Интензитети EPR врхова синглетног кисеоника генерисаног hUKT танким слојевима су готово десет пута већи од референтних.

На слици 6.12.г) приказано је време луминесценце синглетног кисеоника формираног зрачењем hУКТ плавим светлом у хлороформу - крива 1. hУКТ у анаеробним условима нису произвели ниједан синглетни кисеоник (крива 4). Велика вредност квантног приноса формирања синглетног кисеоника за hУКТ,  $\Phi_{\Delta} = 0,31$ , процењена је упоређивањем амплитуде луминесценце са стандардом тетрафенилпорфирина (крива 2,  $\Phi_{\Delta} = 0,50$  у хлороформу) [247]. Треба напоменути да фулерен C<sub>60</sub> (крива 3, израчуната  $\Phi_{\Delta} = 0,86$ ) ефикасније производи синглетни кисеоник.

Добијени животни век дуготрајне луминесценције синглетног кисеоника у хлороформу ( $\tau_L \sim 160 \mu s$ ) за све hУКТ, тетрафенилпорфирин и C<sub>60</sub> одговара подацима из литературе [248] и указује да ове наночестице hУКТ и молекули тетрафенилпорфирин и C<sub>60</sub> нису значајно неутралисала синглетни кисеоник. Производња синглетног кисеоника омогућује примену hУКТ као антибактеријског агенса.

У табели 6.5 приказана је детаљна листа идентификованих хемијских веза. XPS анализа је открила три врсте веза атома угљеника: sp<sup>2</sup> (21,6 атомских%), sp<sup>3</sup> (66,6 атомских%) и кисеонична (11,8 атомских%).

Табела 6.5. Атомске концентрације различитих угљеничних веза у hУКТ-у засноване на XPS мерењима хемијских помака нивоа енергије везе C1s језгра.

Име	Атомска концентрација (%)
C1s sp <sup>2</sup>	21,6
C1s sp <sup>3</sup>	66,6
C1s C-O	6,8
C1s C=O	1,9
C1s O-C=O	3,1
C1s π-π*	0,0

Добијени резултати XPS и PL указали су нам да јака фотолуминесценца hУКТ-а потиче од ефеката ограниченог кретања електрона и рекомбинација електрони-шупљине, као и површинских дефеката узрокованих присуством функционалних група кисеоника на површинама и ивицама hУКТ [241,242].

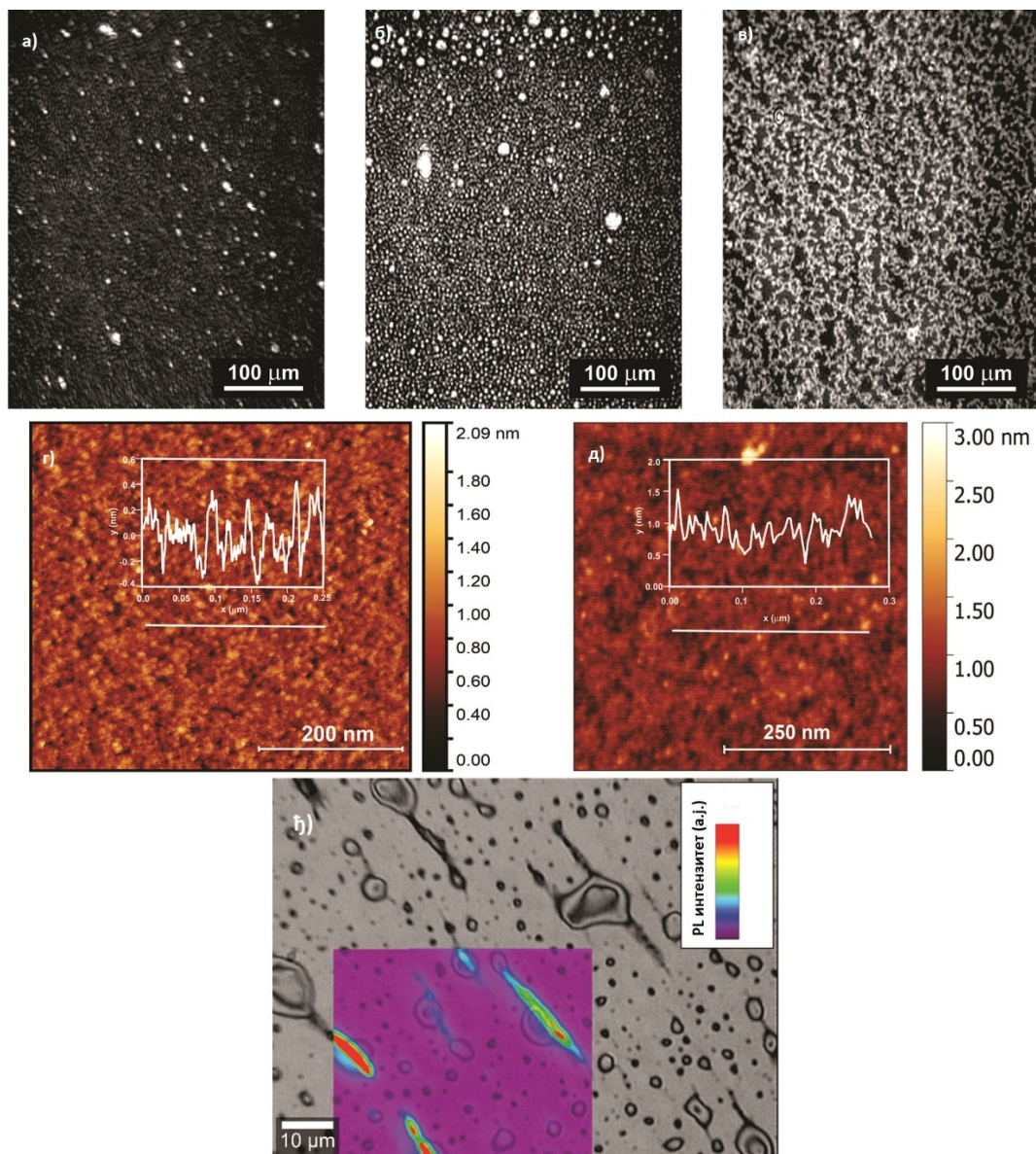
Да би се надгледало формирање LB hУКТ танког слоја у воденој субфази, коришћена је Brewster-ова угаона микроскопија (ВАМ). Посматрана је хомогена нуклеација hУКТ-а у добро издвојеним кластерима наночестица при површинском притиску од 1 mN/m, слика 6.13.а). При вишем површинском притиску од 3 mN/m, слика 6.13.б), посматране су просторно хомогено распоређена hУКТ острва као резултат сједињавања мањих hУКТ острва. При још већем површинском притиску од 13 mN/m формирана је мрежа hУКТ острва, слика 6.13.в).

Једнослојни hУКТ се формира при површинском притиску од приближно  $22 \pm 2$  mN/m, што је показано максималним еластичним модуом [249].

Слика 6.13.г) приказује површинску морфологију и одговарајући профил површине чисте SiO<sub>2</sub>/Si подлоге. Чисти SiO<sub>2</sub>/Si субстрат је доста гладак са RMS средњом храпавошћу од 0,186 nm.

Слика 6.13.д) приказује површинску морфологију и одговарајући површински профил наложеног једнослојног hУКТ на подлоге SiO<sub>2</sub>/Si мерене AFM-ом. LB hУКТ танки слојеви су униформни и хомогени са средњом храпавошћу RMS од 0,3 nm.

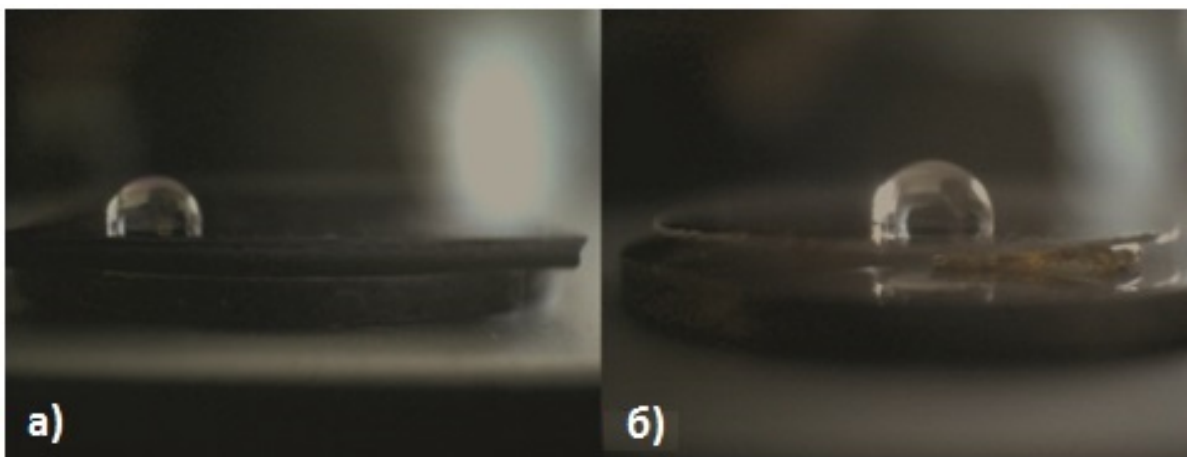
На слици 6.13.г) приказана је оптичка микрографија LB hUKT танких слојева комбинована са фотолуминесцентним мапирањем. PL мапирање показује хомогену луминесценцу на целом слоју, осим на продуженим линијама на којима су већи интензитети луминесценце. Посматране оријентисане линије одговарају локално-колапсираном hUKT монослоју услед једносмерног локалног површинског притиска, који је изнад прага колапсирања монослоја. Локални колапс представља процес савијања монослоја у цев.



Слика 6.13. Сlike Brewster-ове угаоне микроскопије LB hUKT слојева при површинском притиску: а) 1 mN/m, б) 3 mN/m, в) 13 mN/m, г) AFM слика (поглед одозго) са приказом SiO<sub>2</sub>/Si супстрата и одговарајућег површинског профила, д) AFM слика (поглед одозго) са приказом униформног и хомогеног LB hUKT танког слоја и одговарајућег површинског профила, ж) Оптичка микрографија LB hUKT танког слоја комбинована са фотолуминесценцијским мапирањем (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

Хидрофобност површине LB hUKT танких слојева одређује се статичким мерењем контактнoг угла, као што је приказано на сликама 6.14.а),б). Капљице воде су депоноване на LB hUKT слојеве, SiO<sub>2</sub>/Si и лискунску подлогу. Просечне вредности статичких контактних углова су 99,9±0,5°, 98,9±0,5°, за hUKT/SiO<sub>2</sub>/Si и hUKT/лискун узорке, респективно.





Слика 6.14. Мерења контактнoг угла воде са површином: а) hUKT танки слојеви депоновани на SiO<sub>2</sub>/Si, б) hUKT танки слојеви депоновани на лискун (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

Адхезија бактерија и накнадно формирање биослоја зависе од својстава подлоге (храпавост површине и хидрофобичност). Сматра се да су хидрофобне површине погодније за формирање биослоја бактерија [250,251]. Због тога су хидрофобне LB hUKT танке фолије са фотодинамичким карактеристикама идеалне површине за антибактеријске примене, као што су антибактеријски прозори, подови и плафони у онкологији, хематологији и јединицама за опекотине у оквиру болнице.

Да би се потврдила очекивана антибактеријска активност LB hUKT танких слојева, спроведени су антибактеријски тестови на тим слојевима депонованим на стаклу и чистом стаклу без слоја (референца), респективно, и са, односно без зрачења плавом светлошћу. Табела 6.6 приказује резултате антибактеријске активности LB hUKT танких слојева.

Табела 6.6. Антибактеријска активност LB hUKT танких слојева LB hUKT упоређује се са чистим стаклом.

Узорак		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Плаво светло	<sup>(a)</sup> N [CFU/cm <sup>2</sup> ]	<sup>(b)</sup> R у поређењу са неосветљеним чистим стаклом	<sup>(a)</sup> N [CFU/cm <sup>2</sup> ]	<sup>(b)</sup> R у поређењу са неосветљеним чистим стаклом
LB hUKT	Не	2.8x10 <sup>4</sup>	1.1	4.2x10 <sup>3</sup>	1.8
LB hUKT	Да	1.2x10 <sup>4</sup>	1.5	8.0x10 <sup>2</sup>	2.5
Чисто стакло	Не	3.4x10 <sup>5</sup>	U <sub>t</sub> = 5.5	2.5x10 <sup>5</sup>	U <sub>t</sub> = 5.4
Чисто стакло	Да	8.8x10 <sup>4</sup>	0.59	2.8x10 <sup>4</sup>	0.96

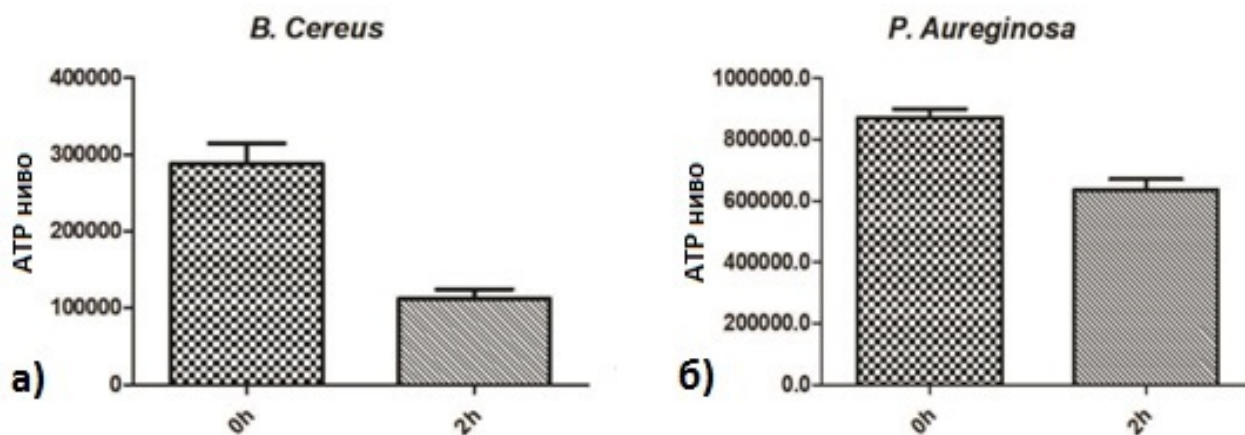
(а) N = број преживелих бактерија које се регенеришу по cm<sup>2</sup> по узорку;

(б) R = антибактеријска активност;

На основу резултата приказаних у табели 6.6 може се закључити да постоји инхибиција раста бактерија на површинама превученим са LB hUKT, али је тај ефекат био различит у случају *S. aureus* и *E. coli*. *E. coli* су осетљивије на површину LB hUKT танких слојева у поређењу са *S. aureus*. Синглетни кисеоник који производе hUKT при зрачењу плавом светлошћу дифундује из LB hUKT танких слојева и убија тестиране бактеријске сојеве.

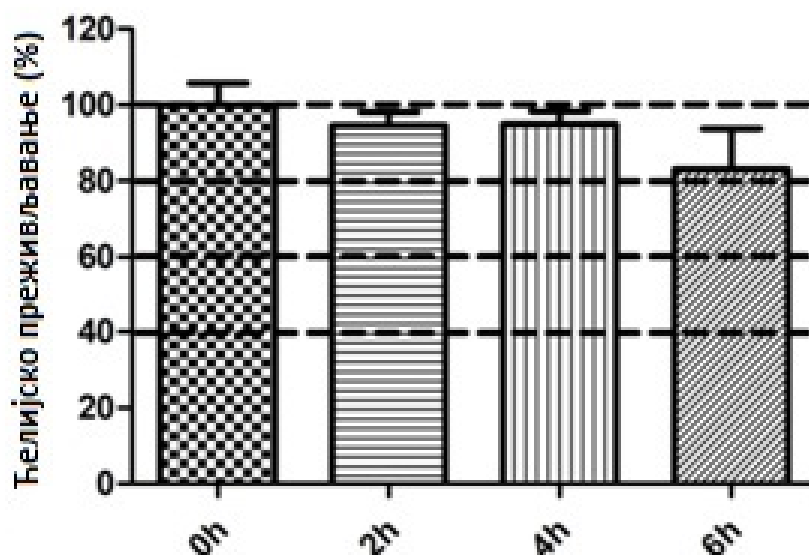
Резултати из табеле 6.6 показују да је велики број бактерија *E. coli* убијен након једног часа. Стога претпостављамо да је могући механизам антибактеријског деловања LB hUKT танких слојева следећи: генерисани синглетни кисеоник напада зид мембране, оштећује га повећањем његове порозности, дозвољава слободним радикалима (на пример синглетни кисеоник) да дођу до цитоплазмичне мембране и проузрокује њену пероксидацију липида (оксидација масти) [252]. Meziani је у свом раду показао да би угљеничне квантне тачке могле бити бактерицидне након зрачења видљивим светлом (LED диода), а чак и у условима обичног природног осветљења [253]. Walker је у свом раду утврдио да медицински силикон који садржи молекуле кристал виолет и метилен блу и наночестице злата од 2 nm делује бактерицидно према *Staphylococcus epidermidis*, *Saccharomyces cerevisiae* и MS2 Bacteriophage само при зрачењу белом светлошћу [245]. Felgentrager је у свом раду показао да фотосензитивни молекули који производе синглетни кисеоник када се депонују на површину неке подлоге (челик, стакло, намештај, итд.), генеришу синглетни кисеоник и ефикасно убијају *S. aureus* (ефикасност > 99,9%) [254].

Даља истраживања која се односе на антибиофулинска својства (својство да се уклони/убије биослој бактерија са подлоге) LB hUKT танких слојева, депонованих на SiO<sub>2</sub>/Si, била су спроведена на *B. cereus* и *P. aureginosa* бактеријске сојеве, слике 6.15.а),б). Хидрофобност, површинска храпавост као и предиспозиција на адсорпцију протеина су главне карактеристике које утичу на способност бактерија да формирају биослој [255]. Постоје супротни резултати који се тичу ефекта хидрофобности на колонизацију бактеријских сојева, али је опште прихваћено да хидрофобне површине привлаче више бактерија. Површински услови LB hUKT танких слојева који се односе на хидрофобност и храпавост (99,9° и 0,3 nm) били су погодни за коришћене бактерије. Наиме, оба коришћена бактеријска соја су формирала биослој на LB hUKT танким слојевима.



Слика 6.15. Антибиотски ефекат LB hUKT танких слојева на *B. cereus* и *P. aureginosa* бактеријским сојевима без (0) и са (2 часа) зрачења плавом светлошћу (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

Формирање *Pseudomonas* биослоја је произведено на површинама са храпавошћу испод 1 nm [255]. После 2 часа осветљавања плавом светлошћу, метаболичка активност у корелацији са бројем преживелих бактеријских ћелија *B. cereus* је смањена за 50%, слика 6.15.а), док је метаболичка активност *P. aureginosa* на LB hUKT танким слојевима била незнатно смањена за исти временски период (2 часа), слика 6.15.б). Смањење броја ћелија било је статистички значајно у оба случаја: *B. cereus* (P-вредност 0,0042) и *P. aureginosa* (P-вредност 0,0069).



Слика 6.16. Цитотоксичност LB hУКТ танких слојева одређена је као проценат преживелих NIH/3Т3 ћелија након зрачења плавим светлом за 2, 4 и 6 часова. Испрекидане линије истичу границу преживљавања према EN ISO 10993-5: виталност > 80 нема цитотоксичности, > 60 - 80 блага цитотоксичност, > 40 - 60 умерена токсичност и < 40 тешка цитотоксичност (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

Иако су већ објављене бројне публикације везане за цитотоксичност GKT [253,256], додатни тест цитотоксичности је спроведен на ћелије ембрионских фибробласта мишева, слика 6.16.

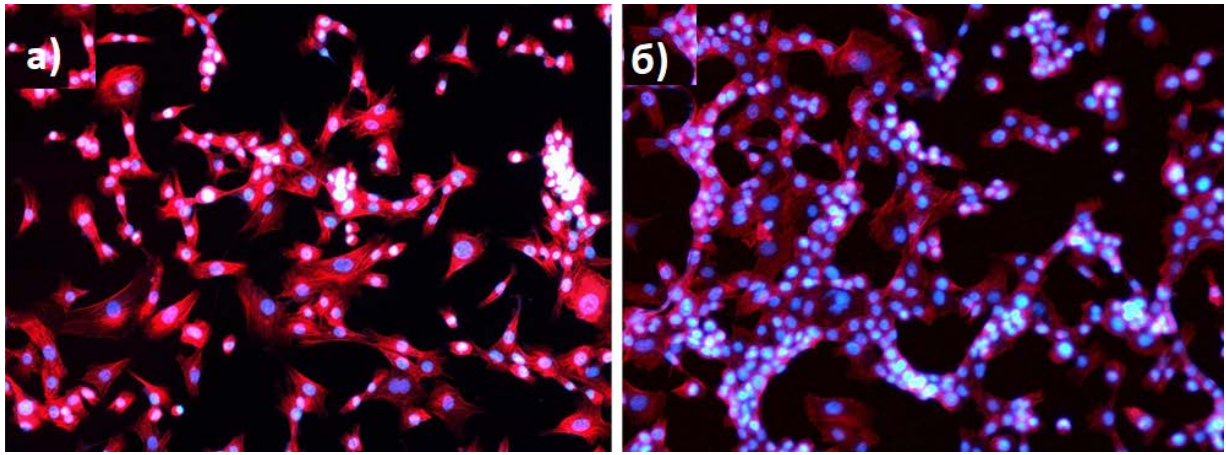
Статистички значајне разлике су пронађене само између неозраченог узорка и узорка који је зрачен 6 часова (P - вредност 0,0313). Резултати су потврдили претходне резултате да је цитотоксичност LB hУКТ танких слојева благо промењена током 6 часова зрачења плавом светлошћу.

Као резултат истраживања установљено је да ћелије рака и нормалне ћелије могу бити отпорније на фототоксичност GKT-а у односу на бактерије [256,257]. Kim је у свом раду открио да ниво изоцитрат дехидрогеназе (IDPс) у ћелијама утиче на смрт ћелије под утицајем синглетног кисеоника [258]. Он тврди да су ћелије са ниским нивоом IDPс осетљивије на смрт под утицајем синглетног кисеоника.

Пероксидација липида, оксидација протеина, оксидативна оштећења DNK и генерисање интрацелуларног пероксида били су већи код ћелијских сојева са нижим нивоом IDPс. Међутим, ћелије са веома високо израженим IDPс-ом показале су повећану резистенцију на синглетни кисеоник, у поређењу са контролним ћелијама.

Слика 6.17 приказује ћелијску морфологију нетретираних ћелија, слика 6.17.а), и ћелија третираних помоћу hУКТ, слика 6.17.б). Као што се види са слике 6.17.б), морфологија ћелија се не мења након третмана са hУКТ.



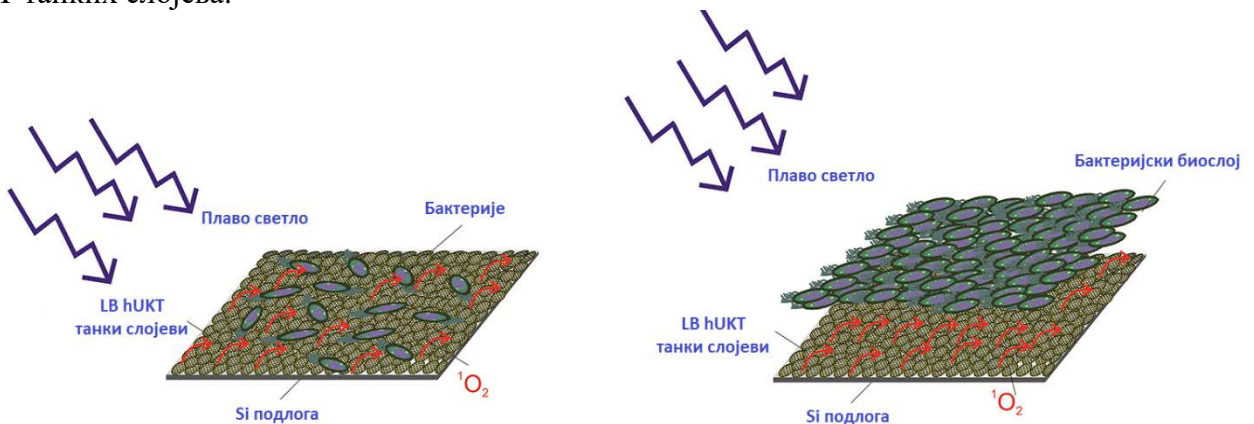


Слика 6.17. а) нетретиране NIH/3T3 ћелије, б) третиране NIH/3T3 ћелије са LB hUKT танким слојевима - DNK је обојена плавом (Hoechst 33258), актин филаменти обојени црвеним (ActinRed™ 555). Увећање је 200 x (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

На основу ових чињеница и добијених резултата може се закључити да коришћени сојеви бактерија и ћелије ембрионских фибробласта мишева користе различите механизме како би се борили са оксидативним стресом [256,259].

На основу података који се односе на антибактеријске и антибиофулинске активности LB hUKT танких слојева, закључили смо да hUKT имају већу ефикасност према грам-негативним бактеријама, *E. coli*, док је бољи антибиофулински ефекат усмерен ка грам-позитивним бактеријама *B. cereus*.

На слици 6.18 приказане су могуће антибактеријске и антибиофулинг активности LB hUKT танких слојева.



Слика 6.18. Приказ могућих антибактеријских и антибиофулинских активности LB hUKT танких слојева (преузето и адаптирано из нашег публикованог рада - реф. [261]).

## 7. Закључак

У оквиру ове докторске дисертације произведена су два потпуно нова типа угљеничних хибридних наноструктура: модификовани електрохемијски ексфолирани графен (*реф.* [260]) и хидрофобне угљеничне квантне тачке (*реф.* [261]).

Први тип материјала је графен произведен електрохемијском ексфолијацијом графита. Променом параметара производње, добијен је транспарентан, вишеслојни и електрично проводан графен, код кога се при одређеним условима могу креирати нанопоре. Тај тип структуре назива се графенска наномрежа. Графенска наномрежа је полупроводни материјал који је до сада врло ретко описиван у литератури.

У експерименталном делу, испитиване су морфолошка, спектроскопска и структурна својства добијених узорака електрохемијски ексфолираног графена и његових модификација. Коришћењем микроскопије атомских сила (AFM) показано је да су произведени графен и графенска наномрежа латералних димензија до 20  $\mu\text{m}$  и са порама димензија до 20 nm. Поре су биле хомогено распоређене по површини графена. Све спектроскопске карактеризације су указале на висок степен дефектности материјала у односу на почетну уређену графенску структуру. Методом електронске парамагнетне резонанце (EPR) утврђено је да ови типови графена не производе синглетни кисеоник и да немају антибактеријску активност. Коришћењем рендгенске фотоелектронске спектроскопије (XPS) утврђено је да однос C/O износи 6,1 и да доминирају  $sp^2$  везе.

Да би поменути материјали постали антибактеријски, функционализовани су хидрофобним молекулима куркумина. Анализе су показале смањење латералних димензија хибрида, као и повећање дефектности узорака. Материјал је заиста добио антибактеријска својства што је потврђено коришћењем више метода. Анализом резултата добијених скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) утврђено је како се мења морфологија и хемијски састав бактеријског зида након интеракције са хибридом графен/куркумин. Спектроскопским анализама (UV-Vis) утврђено је да овај хибрид разара спољни бактеријски зид. Као последица тога, DNK бактерије исцури у ванћелијски простор, што доводи до уништења бактерије.

Други тип испитиваног материјала су хидрофобне угљеничне квантне тачке, које као такве (хидрофобне) до сада нису биле описане у литератури. Хидрофобне угљеничне квантне тачке (hUKT) су синтетисане оригиналним поступком, тј. методом одоздо нагоре. Коришћењем трансмисионе електронске микроскопије (ТЕМ), утврђено је да имају облик елипсоида, латералних димензија у распону од 2 до 20 nm, са средњом вредношћу од око 5 nm. Кристална структура им је врло мало одступала од структуре графита, тј. распоред угљеничних атома у решетки био је изузетно правилан. Анализом резултата добијених рендгенском фотоелектронском спектроскопијом (XPS) утврђено је да код хидрофобних угљеничних квантних тачака однос C/O износи приближно 7 и да доминирају  $sp^3$  везе.

Пошто тачке имају врло мале димензије у оквиру којих електрони морају да осцилују, материјал је био полупроводан и показивао је квантне ефекте, као што је фотолуминесценца. Материјал је емитовао плаво-зелену светлост у зависности од екситације. Квантне тачке такође имају својство да молекуле неутралног кисеоника преведу у молекуле синглетног кисеоника који је изузетно хемијски реактиван молекул. То својство је искоришћено за уништавање бактерија. У првом кораку депоновани су слојеви угљеничних квантних тачака Лангмир-Блоџет поступком на подлоге од силицијума и стакла. На поменуте подлоге депоноване су бактерије, а затим су коришћењем комерцијалне LED диоде слојеви озрачени плавом светлошћу таласне дужине 470 nm. Установљено је да након овог зрачења у трајању од једног часа планктонске бактерије (*E. coli* и *S. aureus*) и биослојеви бивају уништени.

Постављени циљ докторске дисертације је остварен јер су произведена и испитана два потпуно нова типа угљеничних хибридних наноматеријала, који су показали значајна антибактеријска својства. По први пут је показано да се графен успешно може функционализовати куркумином и применити за разне биомедицинске апликације. Успешно је решен проблем хомогеног депоновања слојева угљеничних наноматеријала на потпуно нов начин Лангмир-Блоџет поступком, што отвара нове перспективе не само у биомедицини и испитивању материјала, већ и у органској електроници (на пример за производњу органских LED диода).

Ова докторска дисертација заснована је на наша три публикована рада (видети *ref.* [225,260,261]):

1. Stanković N. K., Todorović Marković B. M., Marković Z. M., ***Self-assembly of carbon based nanoparticles films by Langmuir-Blodgett method***, J. Serb. Chem. Soc. 2020, impact factor = 0.828, DOI: 10.2298/JSC191225008S.

2. Marković Z. M., Kepić D. P., Matijašević D. M., Pavlović V. B., Jovanović S. P., Stanković N. K., Milivojević D. D., Spitalsky Z., Holclajtner-Antunović I. D., Bajuk-Bogdanović D. V., Nikšić M. P., Todorović-Marković B. M., ***Ambient light induced antibacterial action of curcumin/graphene nanomesh hybrids***, RSC Advances 2017, 57(7), 36081-36092, impact factor = 3.1, DOI: 10.1039/C7RA05027E.

3. Stanković N. K., Bodik M., Šiffalović P., Kotlar M., Mičušik M., Špitalsky Z., Danko M., Milivojević D. D., Kleinova A., Kubat P., Capakova Z., Humpolicek P., Lehocky M., Todorović-Marković B. M., Marković\* Z. M., ***Antibacterial and Antibiofouling Properties of Light Triggered Fluorescent Hydrophobic Carbon Quantum Dots Langmuir-Blodgett Thin Films***, ACS Sustainable Chem. Eng. 2018, impact factor = 5.9, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b04566.

## 8. Литература

- [1] Parvez K., *Dissertation: Chemical exfoliation of graphene and its application in organic electronics and energy storage devices*, zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften" im Fachbereich Chemie, Pharmazie, und Geowissenschaften der *Johannes Gutenberg-Universität Mainz* und in Kooperation mit dem *Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz*, 2014.
- [2] [www.sigmaaldrich.com/AT/de/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/graphene-quantum-dots](http://www.sigmaaldrich.com/AT/de/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/graphene-quantum-dots).
- [3] Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., Smalley R. E., *C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene*, *Nature* 1985, 318, 162.
- [4] Iijima S., *Synthesis of Carbon Nanotubes*, *Nature* 1991, 354, 56.
- [5] Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grigorieva I. V., Firsov A. A., *Electric field effect in atomically thin carbon films*, *Science* 2004, 306(5696), 666-669.
- [6] Bolotin K. I., Sikes K. J., Jiang Z., Klima M., Fudenberg G., Hone J., Kim P., Stormer H. L., *Ultrahigh electron mobility in suspended graphene*, *Solid State Commun.* 2008, 146, 351.
- [7] Morozov S. V., Novoselov K. S., Katsnelson M. I., Schedin F., Elias D. C., Jaszczak J. A., Geim A. K., *Giant Intrinsic Carrier Mobilities in Graphene and Its Bilayer*, *Phys. Rev. Lett.* 2008, 100.
- [8] Balandin A. A., Ghosh S., Bao W. Z., Calizo I., Teweldebrhan D., Miao F., Lau C. N., *Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene*, *Nano Lett.* 2008, 8, 902.
- [9] Lee C., Wei X. D., Kysar J. W., Hone J., *Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene*, *Science* 2008, 321, 385.
- [10] Nair R. R., Blake P., Grigorenko A. N., Novoselov K. S., Booth T. J., Stauber T., Peres N. M. R., Geim A. K., *Fine structure constant defines visual transparency of graphene*, *Science* 2008, 320(5881), 1308.
- [11] Blake P., Brimicombe P. D., Nair R. R., Booth T. J., Jiang D., Schedin F., Ponomarenko, L. A., Morozov S. V., Gleeson H. F., Hille W., Geim A. K., Novoselov K. S., *Graphene-based Liquid crystal devices*, *Nano Lett.* 2008, 8, 1704-1708.
- [12] Wang X., Zhi L. J., Mullen K., *Transparent, Conductive Graphene Electrodes for Dye-Sensitized Solar Cells*, *Nano Lett.* 2008, 8, 323.
- [13] Son D. I., Kim T. W., Shim J. H., Jung J. H., Lee D. U., Lee J. M., Il Park W., Choi W. K., *Flexible Organic Bistable Devices Based on Graphene Embedded in an Insulating Poly(methyl methacrylate) Polymer Layer*, *Nano Lett.* 2010, 10, 2441.
- [14] De Arco L. G., Zhang Y., Schlenker C. W., Ryu K., Thompson M. E., Zhou C. W., *Continuous, highly flexible, and transparent graphene films by chemical vapor deposition for organic photovoltaics*, *ACS Nano* 2010, 4, 2865.
- [15] Gunes F., Han G. H., Kim K. K., Kim E. S., Chae S. J., Park M. H., Jeong H. K., Lim S. C., Lee Y. H., *Large-area graphene-based flexible transparent conducting films*, *Nano* 2009, 4, 83.

- [16] Su Q., Pang S. P., Alijani V., Li, C., Feng X. L., Mullen K., *Composites of Graphene with Large Aromatic Molecules*, *Adv. Mater.* 2009, 21, 3191.
- [17] Matyba P., Yamaguchi H., Eda G., Chhowalla M., Edman L., Robinson N. D., *Graphene and mobile ions: The key to all-plastic, solution-processed light-emitting devices*, *ACS Nano* 2010, 4, 637.
- [18] Jo G., Choe M., Cho C. Y., Kim J. H., Park W., Lee S., Hong W. K., Kim T. W., Park S. J., Hong B. H., Kahng Y. H., Lee T., *Large-scale patterned multi-layer graphene films as transparent conducting electrodes for GaN light-emitting diodes*, *Nanotechnology* 2010, 21.
- [19] Bae S., Kim H., Lee Y., Xu X., Park J. S., Zheng Y., Balakrishnan J., Lei T., Kim H. R., Song Y. I., Kim Y. J., Kim K. S., Özyilmaz B., Ahn J. H., Hong B. H., Iijima S., *Roll-to-roll production of 30 inch graphene films for transparent electrodes*, *Nat. Nanotechnol.* 2010, 4, 574-578.
- [20] Pang S. P., Tsao H. N., Feng X. L., Mullen K., *Patterned Graphene Electrodes from Solution-Processed Graphite Oxide Films for Organic Field-Effect Transistors*, *Adv. Mater.* 2009, 21, 3488.
- [21] Parvez K., Li R. J., Puniredd S. R., Hernandez Y., Hinkel F., Wang S. H., Feng X. L., Mullen K., *Electrochemically exfoliated graphene as solution-processable, highly conductive electrodes for organic electronics*, *ACS Nano* 2013, 7, 3598.
- [22] Cao Y., Liu S., Shen Q., Yan K., Li P. J., Xu J., Yu D. P., Steigerwald M. L., Nuckolls C., Liu Z. F., Guo X. F., *Surface-Directed Molecular Assembly of Pentacene on Monolayer Graphene for High-Performance Organic Transistors*, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 2743.
- [23] Pang S. P., Yang S. B., Feng X. L., Mullen K., *Coplanar Asymmetrical Graphene-Titanium Electrodes for Polymer Photodetectors*, *Adv. Mater.* 2012, 24, 1566.
- [24] Lee K. R., Lee K. U., Lee J. W., Ahn B. T., Woo S. I., *Electrochemical oxygen reduction on nitrogen doped graphene sheets in acid media*, *Electrochem. Commun.* 2010, 12, 1052.
- [25] Parvez K., Yang S. B., Hernandez Y., Winter A., Turchanin A., Feng X. L., Mullen K., *Exfoliation of Graphite into Graphene in Aqueous Solutions of Inorganic Salts*, *ACS Nano* 2012, 6, 9541.
- [26] Wu Z. S., Parvez K., Feng X., Mullen K., *Graphene-based in-plane micro-supercapacitors with high power and energy densities*, *Nat. Commun.* 2013, 4, 2487.
- [27] Yoo J. J., Balakrishnan K., Huang J. S., Meunier V., Sumpter B. G., Srivastava A., Conway M., Reddy A. L. M., Yu J., Vajtai R., Ajayan P. M., *Ultrathin planar graphene supercapacitors*, *Nano Lett.* 2011, 11, 1423.
- [28] Bi H., Chen J., Zhao W., Sun S. R., Tang Y. F., Lin T. Q., Huang F. Q., Zhou X. D., Xie X. M., Jiang M. H., *Highly conductive and flexible paper of 1D silver-nanowire-doped graphene*, *Rsc Adv.* 2013, 3, 8454.
- [29] Wu Z. S., Ren W. C., Xu L., Li F., Cheng H. M., *Doped graphene sheets as anode materials with superhigh rate and large capacity for lithium ion batteries*, *ACS Nano* 2011, 5, 5463.
- [30] Geim A. K., Novoselov K. S., *The rise of graphene*, *Nat. Mater.* 2007, 6, 183-191.

- [31] Novoselov K. S., Jiang D., Schedin F., Booth T. J., Khotkevich V. V., Morozov S. V., Geim A. K., *Two-dimensional atomic crystals*, *P. Natl. Acad. Sci.* 2005, *102*, 10451.
- [32] Hernandez Y., Nicolosi V., Lotya M., Blighe F. M., Sun Z. Y., De S., McGovern I. T., Holland B., Byrne M., Gunko Y. K., Boland J. J., Niraj P., Duesberg G., Krishnamurthy S., Goodhue R., Hutchison J., Scardaci V., Ferrari A. C., Coleman J. N., *High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite*, *Nat. Nanotechnol* 2008, *3*, 563.
- [33] Khan U., O'Neill A., Lotya M., De S., Coleman J. N., *High-concentration solvent exfoliation of graphene*, *Small* 2010, *6*, 864.
- [34] Lotya M., Hernandez Y., King P. J., Smith R. J., Nicolosi V., Karlsson L. S., Blighe F. M., De S., Wang Z. M., McGovern I. T., Duesberg G. S., Coleman J. N., *Liquid phase production of graphene by exfoliation of graphite in surfactant/water solutions*, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 3611.
- [35] Marago O. M., Bonaccorso F., Saija R., Privitera G., Gucciardi P. G., Iati M. A., Calogero G., Jones P. H., Borghese F., Denti P., Nicolosi V., Ferrari A. C., *Brownian Motion of Graphene*, *ACS Nano* 2010, *4*, 7515.
- [36] Green A. A., Hersam M. C., *Solution Phase Production of Graphene with Controlled Thickness via Density Differentiation*, *Nano Lett.* 2009, *9*, 4031.
- [37] Lotya M., King P. J., Khan U., De S., Coleman J. N., *High-concentration, surfactant-stabilized graphene dispersions*, *Acs Nano* 2010, *4*, 3155.
- [38] Bonaccorso F., Lombardo A., Hasan T., Sun Z. P., Colombo L., Ferrari A. C., *Production, Processing and Placement of Graphene and Two Dimensional Crystals*, *Mater. Today* 2012, *15*, 564.
- [39] Brodie B. C., *Sur le poids atomique de graphite*, *Ann. Chim. Phys.* 1860, *59*, 466.
- [40] Hummers W. S., Offeman R. E., *Preparation of Graphitic Oxide*, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, *80*, 1339.
- [41] Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D., Kohlhaas K. A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu, Y., Nguyen S. T., Ruoff R. S., *Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*, *Carbon* 2007, *45*, 1558-1565.
- [42] Stankovich S., Piner R. D., Nguyen S. T., Ruoff R. S., *Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets*, *Carbon* 2006, *44*, 3342.
- [43] Lerf A., He H. Y., Forster M., Klinowski J., *Structure of Graphite Oxide Revisited*, *J. Phys. Chem. B* 1998, *102*, 4477.
- [44] He H. Y., Klinowski J., Forster M., Lerf A., *A new structural model for graphite oxide*, *Chem. Phys. Lett.* 1998, *287*, 53.
- [45] Cai W. W., Piner R. D., Stadermann F. J., Park S., Shaibat M. A., Ishii Y., Yang D. X., Velamakanni A., An S. J., Stoller M., An J. H., Chen D. M., Ruoff R. S., *Synthesis and solid-state NMR structural characterization of <sup>13</sup>C-labeled graphite oxide*, *Science* 2008, *321*, 1815.
- [46] Park S., Ruoff R. S., *Chemical methods for the production of graphenes*, *Nat. Nanotechnol* 2009, *4*, 217-224.



- [47] Park S., Hu Y. C., Hwang J. O., Lee E. S., Casabianca L. B., Cai W. W., Potts J. R., Ha H. W., Chen S. S., Oh J., Kim S. O., Kim Y. H., Ishii Y., Ruoff R. S., *Enhanced Cell Capture on Functionalized Graphene Oxide Nanosheets through Oxygen Clustering*, *Nat. Commun.* 2012, 3.
- [48] Singh V., Joung D., Zhai L., Das S., Khondaker S. I., Seal S., *Graphene based materials: Past, present and future*, *Prog. Mater. Sci.* 2011, 56, 1178.
- [49] Bourlinos A. B., Gournis D., Petridis D., Szabo T., Szeri A., Dekany I., *Graphite oxide, chemical reduction to graphite and surface modification with primary aliphatic amines and amino acids*, *Chem. Mater.* 2003, 19, 6050-6055.
- [50] Stankovich S., Dikin D. A., Dommett G. H. B., Kohlhaas K. M., Zimney E. J., Stach E. A., Piner R. D., Nguyen S. T., Ruoff R. S., *Graphene-based composite materials*, *Nature* 2006, 442, 282-286.
- [51] Mattevi C., Eda G., Agnoli S., Miller S., Mkhoyan K. A., Celik O., Mostrogiovanni D., Granozzi G., Garfunkel E., Chhowalla M., *Evolution of Electrical, Chemical, and Structural Properties of Transparent and Conducting Chemically Derived Graphene Thin Films*, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 2577.
- [52] Yang, D.; Velamakanni, A.; Bozoklu, G.; Park, S.; Stoller, M.; Piner, R. D.; Stankovich, S.; Jung, I.; Field, D. A.; Ventrice, C. A.; Ruoff, R. S., *Chemical analysis of graphene oxide films after heat and chemical treatments by X-ray photoelectron and Micro-Raman spectroscopy*, *Carbon* 2009, 47, 145.
- [53] Boukhvalov D. W., Katsnelson M. I., *Modeling of Graphite Oxide*, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 10697.
- [54] Gomez-Navarro C., Meyer J. C., Sundaram R. S., Chuvilin A., Kurasch S., Burghard M., Kern K., Kaiser U., *Atomic structure of reduced graphene oxide*, *Nano Lett.* 2010, 10, 1144.
- [55] Bagri A., Mattevi C., Acik M., Chabal Y. J., Chhowalla M., Shenoy V. B., *Structural evolution during the reduction of chemically derived graphene oxide*, *Nat. Chem.* 2010, 2, 581.
- [56] Lang B., *A LEED study of the deposition of carbon on platinum crystal surfaces*, *Surf Sci* 1975, 53, 317.
- [57] Sutter P. W., Flege J. I., Sutter E. A., *Epitaxial graphene on ruthenium*, *Nat. Mater.* 2008, 7, 406.
- [58] Coraux J., N'Diaye A. T., Busse C., Michely T., *Structural Coherency of Graphene on Ir(111)*, *Nano Lett.* 2008, 8, 565.
- [59] Hamilton J. C., Blakely J. M., *Carbon segregation to single crystal surfaces of Pt, Pd and Co*, *Surf. Sci.* 1980, 91, 199.
- [60] Hu Z. P., Ogletree D. F., Vanhove M. A., Somorjai G. A., *Leed theory for incommensurate overlayers: Application to graphite on Pt(111)*, *Surf. Sci.* 1987, 180, 433.
- [61] Reina A., Jia X. T., Ho J., Nezich D., Son H. B., Bulovic V., Dresselhaus M. S., Kong J., *Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition*, *Nano Lett.* 2009, 9, 30.
- [62] Kumar S., McEvoy N., Lutz T., Keeley G. P., Nicolosi V., Murray C. P., Blau W. J., Duesberg G. S., *Gas phase controlled deposition of high quality large-area graphene films*, *Chem. Commun.* 2010, 46, 1422.

- [63] Wei D. C., Liu Y. Q., Wang Y., Zhang H. L., Zhang L. P., Yu G., *Synthesis of N-doped graphene by chemical vapor deposition and its electrical properties*, *Nano Lett.* 2009, 9, 1752.
- [64] Li X. S., Cai W. W., An J. H., Kim S., Nah J., Yang D. X., Piner R., Velamakanni A., Jung I., Tutuc E., Banerjee S. K., Colombo L., Ruoff R. S., *Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils*, *Science* 2009, 324, 1312.
- [65] Obraztsov A. N., Obraztsova E. A., Tyurnina A. V., Zolotukhin A. A., *Chemical vapor deposition of thin graphite films of nanometer thickness*, *Carbon* 2007, 45, 2017.
- [66] Hao Y. F., Bharathi M. S., Wang, L., Liu Y. Y., Chen H., Nie S., Wang X. H., Chou H., Tan C., Fallahazad B., Ramanarayan H., Magnuson C. W., Tutuc E., Yakobson B. I., McCarty K. F., Zhang Y. W., Kim P., Hone J., Colombo L., Ruoff R. S., *The role of surface oxygen in the growth of large single-crystal graphene on copper*, *Science* 2013, 342, 720.
- [67] Lin Y. C., Jin C. H., Lee J. C., Jen S. F., Suenaga K., Chiu P. W., *Clean transfer of graphene for isolation and suspension*, *ACS Nano* 2011, 5, 2362.
- [68] Pirkle A., Chan J., Venugopal A., Hinojos D., Magnuson C. W., McDonnell S., Colombo L., Vogel E. M., Ruoff R. S., Wallace R. M., *Reducing extrinsic performance-limiting factors in graphene grown by chemical vapor deposition*, *Appl. Phys. Lett.* 2011, 99.
- [69] Mattevi C., Kim H., Chhowalla M., *A review of chemical vapour deposition of graphene on copper*, *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 3324.
- [70] Zhang Y., Zhang L. Y., Zhou C. W., *Review of Chemical Vapor Deposition of Graphene and Related Applications*, *Accounts Chem. Res.* 2013, 46, 2329.
- [71] Blake P., Hill E. W., Neto A. H. C., Novoselov K. S., Jiang D., Yang R., Booth T. J., Geim A. K., *Making graphene visible*, *Appl. Phys. Lett.* 2007, 91, 063124.
- [72] Tung V. C., Allen M. J., Yang Y., Kaner R. B., *High-throughput solution processing of large-scale graphene*, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 25.
- [73] Valles C., Drummond C., Saadaoui H., Furtado C. A., He M., Roubeau O., Ortolani L., Monthieux M., Penicaud A., *Solutions of negatively charged graphene sheets and ribbons*, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 15802.
- [74] Jung I., Vaupel M., Pelton M., Piner R., Dikin D. A., Stankovich S., An J., Ruoff R. S., *Characterization of Thermally Reduced Graphene Oxide by Imaging Ellipsometry*, *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, 8499.
- [75] Kim K. S., Zhao Y., Jang H., Lee S. Y., Kim J. M., Kim K. S., Ahn J. H., Kim P., Choi J. Y., Hong B. H., *Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes*, *Nature* 2009, 457, 706.
- [76] Ferrari A. C., Meyer J. C., Scardaci V., Casiraghi C., Lazzeri M., Mauri F., Piscanec S., Jiang D., Novoselov K. S., Roth S., Geim A. K., *Raman spectrum of graphene and graphene layers*, *Phys. Rev. Lett.* 2006, 97.
- [77] Malard L. M., Pimenta M. A., Dresselhaus G., Dresselhaus M. S., *Raman spectroscopy in graphene*, *Phys. Rep.* 2009, 473, 51.

- [78] Pimenta M. A., Dresselhaus G., Dresselhaus M. S., Cancado L. G., Jorio A., Saito R., *Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, 9, 1276.
- [79] Eckmann A., *Dissertation: Raman spectroscopy of graphene, its derivatives and graphene-based heterostructures*, *The University of Manchester, Faculty of Engineering and Physical Sciences, School of Chemistry*, 2013.
- [80] Geimand A. K., MacDonald A. H., Graphene: Exploring carbon flatland, *Phys. Today* 2007, 60, 35.
- [81] Castro Neto A. H., Guinea F., Peres N. M. R., Novoselov K. S., Geim A. K., The electronic properties of graphene, *Rev. Mod. Phys* 2009, 81, 109-162.
- [82] Radonjić M., Kvantni Holov efekat u grafenu, Univerzitet u Beogradu, Fizički fakultet, Beograd, 2007.
- [83] Casiraghi C., Hartschuh A., Qian H., Piscanec S., Georgi C., Fasoli A., Novoselov K. S., Basko D. M., Ferrari A. C., Rayleigh imaging of graphene and graphene layers, *Nano Lett.* 2009, 9, 1433,
- [84] Hecht E., *Optics*. Addison-Wesley 2008.
- [85] Xia F., Mueller T., Lin Y. M., Valdes-Garcia A., Avouris P., Ultrafast graphene photodetector, *Nat. Nanotechnolog.* 2009, 4, 839-843.
- [86] Sachs B., Britnell L., Wehling T. O., Eckmann A., Jalil R., Belle B. D., Lichtenstein A. I., Katsnelson M. I., Novoselov K. S., Doping mechanisms in graphene-MoS<sub>2</sub> hybrids. arXiv, 2013, 1304, 2236.
- [87] Lee C., Wei X., Kysar J. W., Hone J., Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene, *Science* 2008, 321(5887), 385-388.
- [88] Tan X., Wu J., Zhang K., Peng X., Sun L., Zhong J., Nanoindentation models and Young's modulus of monolayer graphene: A molecular dynamics study, *Appl. Phys. Lett.* 2013, 102, 071908.
- [89] Geim A. K., Graphene: Status and prospects, *Science* 2009, 324, 1530.
- [90] Bunch J. S., Verbridge S. S., Alden J. S., van der Zande A. M., Parpia J. M., Craighead H. G., McEuen P. L., Impermeable atomic membranes from graphene sheets, *Nano Lett.* 2008, 8(8), 2458-2462.
- [91] Schedin F., Geim A. K., Morozov S. V., Hill E. W., Blake P., Katsnelson M. I., Novoselov K. S., Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene, *Nat. Mater.* 2007, 6, 652-655.
- [92] Jiang D., Cooper V. R., Dai S., Porous graphene as the ultimate membrane for gas separation, *Nano Lett.* 2009, 9(12), 4019-4024.
- [93] Schrier J., Helium separation using porous graphene membranes. *J. Phys. Chem. C* 2010, 1(15), 2284-2287.
- [94] Du H., Li J., Zhang J., Su G., Li X., Zhao Y., Separation of hydrogen and nitrogen gases with porous graphene membrane, *J. Phys. Chem. C* 2011, 115(47), 23261-23266.
- [95] Siwy Z. S., Davenport M., Nanopores: Graphene opens up to DNA. *Nat. Nanotechnolog.* 2010, 5, 697-698.

- [96] Postma H. W. C., Rapid sequencing of individual DNA molecules in graphene nanogaps, *Nano Lett.* 2010, 10(2), 420-425.
- [97] Merchant C. A., Healy K., Wanunu M., Ray V., Peterman N., Bartel J., Fischbein M. D., Venta K., Luo Z., Charlie Johnson A. T., Drndic M., DNA translocation through graphene nanopores, *Nano Lett.* 2010, 10(8), 2915-2921.
- [98] Ramanathan T., Abdala A. A., Stankovich S., Dikin D. A., Alonso M. H., Piner R. D., et al. Functionalized graphene sheets for polymer nanocomposites, *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, 327-331.
- [99] Lee Y. R., Raghu A. V., Jeong H. M., Kim B. K., Properties of waterborne polyurethane functionalized graphene sheet nanocomposites prepared by an in situ method, *Macromol. Chem. Phys.* 2009, 210, 1247-1254.
- [100] Xu Y., Wang Y., Jiajie L., Huang Y., Ma Y., Wan X., et al. A hybrid material of graphene and poly (3,4-ethyldioxythiophene) with high conductivity, flexibility and transparency, *Nano Res.* 2009, 2, 343-348.
- [101] Quan H., Zhang B., Zhao Q., Yuen R. K. K., Li R. K. Y., Facile preparation and thermal degradation studies of graphite nanoplatelets (GNPs) filled thermoplastic polyurethane (TPU) nanocomposites, *Compos. Pt. A* 2009, 40, 1506-1513.
- [102] Das T. K., Prusty S., *Graphen-Based Polymer Composites and Their Applications*, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2013, 52, 319-331.
- [103] Zhang Y. B., Tan Y. W., Stormer H. L., Kim P., Experimental observation of the quantum Hall effect and Berry's phase in graphene, *Nature* 2005, 438, 201.
- [104] Kedzierski J., Hsu P. L., Healey P., Wyatt P. W., Keast C. L., Sprinkle M., Berger C., de Heer W. A., Epitaxial graphene transistors on SiC substrates, *Ieee T Electron. Dev.* 2008, 55, 2078.
- [105] Miller J. R., Outlaw R. A., Holloway B. C., Graphene double-layer capacitor with ac line-filtering performance, *Science* 2010, 329, 1637.
- [106] Xia J. L., Chen F., Li J. H., Tao N. J., Measurement of the quantum capacitance of graphene, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 505.
- [107] Eda G., Lin Y. Y., Miller S., Chen C. W., Su W. F., Chhowalla M., Transparent and conducting electrodes for organic electronics from reduced graphene oxide, *Appl. Phys. Lett.* 2008, 92, 233305-1-3.
- [108] Wu J., Becerril H. A., Bao Z., Liu Z., Chen Y., Peumans P., Organic solar cells with solution processed graphene transparent electrodes, *Appl. Phys. Lett.* 2008, 92, 263302-1-3.
- [109] Hong W., Xu Y., Lu G., Li C., Shi G., Transparent graphene-PEDOT-PSS composite films as counter electrodes of dye-sensitized solar cells, *Electrochem. Comm.* 2008, 10, 1555-1558.
- [110] Gomez De Arco L., Zhang Y., Schlenker C. W., Ryu K., Thompson M. E., Zhou C., Continuous, highly flexible, and transparent graphene films by chemical vapor deposition for organic photovoltaics, *ACS Nano.* 2010, 25, 4 (5), 2865-2873.

- [111] Li S. S., Tu K. H., Lin C. C., Chen C. W., Chhowalla M., Solution processable grapheme oxide as an efficient hole transport layer in polymer solar cells, *ACS Nano*. 2010, 4, 3169-3174.
- [112] Valentini L., Cardinali M., Bon S. B., Bagnis D., Verdejo R., Lopez Manchado M. A., Kenny J. M., Use of butylamine modified graphene sheets in polymer solar cells, *J. Mater. Chem*. 2010, 20, 995-1000.
- [113] Wang X., Zhi L., Mullen K., Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells, *Nano Lett*. 2007, 9, 323-327.
- [114] Li S. S., Tu K. H., Lin C. C., Chen C. W., Chhowalla M., Graphene oxide-polyelectrolyte Nanomembranes, *ACS Nano*. 2010, 4, 3169-3174.
- [115] Eda G., Unalan H. E., Rupesinghe N. L., Amaratunga G. A. J., Chhowalla M., Field emission from graphene based composite thin films, *Appl. Phys. Lett*. 2008, 93, 233502-233503.
- [116] Verma V. P., Das S., Lahiri I., Choi W., Large-area graphene on polymer film for flexible and transparent anode in field emission device, *Appl. Phys. Lett*. 2010, 96, 203108-1-3.
- [117] Lee Y., Bae S., Jang H., Jang S., Zhu S. E., Sim S. H., Song Y. I., Hong B. H., Ahn J. H., Wafer-scale synthesis and transfer of graphene films, *Nano Lett*. 2010, 10 (2), 490-493.
- [118] Yoo E., Kim J., Hosono E., Zhou H. S., Kudo T., Honma I., Large reversible Li storage of graphene nanosheet families for use in rechargeable Lithium ion batteries, *Nano Lett*. 2008, 8, 2277-2282.
- [119] Song Z., Xu T., Gordin M. L., Jiang Y. B., Bae I. T., Xiao Q., Zhan H., Liu J., Wang D., Polymer - Graphene nanocomposites as ultrafast-charge and discharge cathodes for rechargeable Lithium batteries, *Nano Lett*. 2012, 12, 22205-22211.
- [120] Dan Y., Lu Y., Kybert N. J., Luo Z., Johnson A. T. C., Intrinsic response of graphene vapor sensors, *Nano Lett*. 2009, 9, 1472-1475.
- [121] Tang L., Wang Y., Li Y., Feng H., Lu J., Li J., Preparation, structure, and electrochemical properties of reduced graphene sheet films, *Adv. Funct. Mater*. 2009, 19, 2782-2789.
- [122] Ohno Y., Maehashi K., Yamashiro Y., Matsumoto K., Electrolyte-gated graphene field-effect transistors for detecting pH and protein adsorption, *Nano Lett*. 2009, 9, 3318-3322.
- [123] Mohanty N., Berry V., Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and dna transistor, interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents, *Nano Lett*. 2008, 8, 4469-4476.
- [124] Liu J. Q., Tao L., Yang W. R., Li D., Boyer C., Wuhler R., Braet F., Davis T. P., Synthesis, characterization, and multilayer assembly of pH sensitive graphene-polymer nanocomposites, *Langmuir* 2010, 26, 10068-10075.
- [125] Chen L., Chen G., Lu L., Piezoresistive behavior study on finger-sensing silicone rubber-graphite nanosheet nanocomposites, *Adv. Funct. Mater*. 2007, 17, 898-904.
- [126] Ansari S., Giannelis E. P., Functionalized graphene sheet-Poly(vinylidene fluoride) conductive nanocomposites, *J. Polym. Sci. Pt. B Polym. Phys*. 2009, 47, 888-897.

- [127] Xu C., Wang X., Wang J., Hu H., Wan L., Synthesis and photo-electrical properties of  $\beta$ -Cyclodextrin functionalized graphene materials with high bio-recognition capability, *Chem. Phys. Lett.* 2010, 498, 162-167.
- [128] Shan C., Yang H., Song J., Han D., Ivaska A., Niu L., Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene, *Anal. Chem.* 2009, 81 (6), 2378-2382.
- [129] Li H.T., He X.D., Kang Z.H., Huang H., Liu Y., Liu J.L., Lian S.Y., Tsang C.H.A., Yang X.B., Lee S.T., Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design, *Angew Chem Int Edit* 2010, 49, 4430-4434.
- [130] Zhou J., Booker C., Li R., Zhou X., Sham T.K., Sun X., Ding Z., An electrochemical avenue to blue luminescent nanocrystals from multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs), *J Am Chem Soc.* 2007, 129, 744-745.
- [131] Lu J., Yang J.X., Wang J., Lim A., Wang S., Loh K.P., One-pot synthesis of fluorescent carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids, *Acs Nano* 2009, 3, 2367-2375.
- [132] Molitor F., Guttinger J., Stampfer C., Droscher S., Jacobsen A., Ihn T., Ensslin K., Electronic Properties of Graphene Nanostructures, *J. Phys. Condens. Matter* 2011, 23, 243201.
- [133] Jovanovic S. P., Marković Z. M., Kleut D. N., Tosic D. D., Kepic D. P., Marinovic-Cincovic M. T., Holclajtner-Antunovic I. D., Todorovic-Marković, B. M., Covalent Modification of Single Wall Carbon Nanotubes Upon Gamma Irradiation in Aqueous Media, *Hem. Ind.* 2011, 65, 479-487.
- [134] Kleut D., Jovanovic S., Marković Z., Kepic D., Tosic D., Romcević N., Marinovic-Cincović M., Dramicanin M., Holclajtner-Antunovic I., Pavlovic V., Drazic G., Milosavljevic M., Todorović-Marković B., Comparison of Structural Properties of Pristine and Gamma Irradiated Single-wall Carbon Nanotubes: Effects of Medium and Irradiation Dose, *Mater. Charact.* 2012, 72, 37-45.
- [135] Kleut D. N., Markovic Z. M., Babic B. M., Holclajtner Antunovic I. D., Milosavljevic M. S., Dramicanin M. D., Todorović-Markovic B. M., Raman Spectroscopy Study of Carbon-doped Resorcinol-formaldehyde Thin Films, *Phys. Scr.* 2013, T157, 014039.
- [136] Tosic D., Markovic Z., Dramicanin M., Holclajtner Antunovic I., Jovanovic S., Milosavljevic M., Pantic J., Todorović-Marković B., Gamma Ray Assisted Fabrication of Fluorescent Oligographene Nanoribbons, *Mater. Res. Bull.* 2012, 47, 1996-2000.
- [137] Jovanović S. P., Syrgiannis Z., Marković Z. M., Bonasera A., Kepić D. P., Budimir M. D., Milivojević D. D., Spasojević V. D., Dramićanin M. D., Pavlović V. B., Todorović-Marković B. M., Modification of Structural and Luminescence Properties of Graphene Quantum Dots by Gamma Irradiation and Their Application in a Photodynamic Therapy, *ACS Applied Materials & Interfaces* 2015, 7(46), pp. 25865-25874, impact factor= 7.5, number of citation=12.
- [138] Liu Z., Robinson J. T., Sun X. M., et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs, *J Am Chem Soc.* 2008, 130(33), 10876-10877.
- [139] Shen H., Zhang L., Liu M., Zhang Z., Biomedical Applications of Graphene, *Theranostics* 2012, 2(3), 283-294.



- [140] Shan C. S., Yang H. F., Han D. X., et al. Water-soluble graphene covalently functionalized by biocompatible poly-L-lysine, *Langmuir* 2009, 25(20), 12030-12033.
- [141] Lei H. Z., Mi L. J., Zhou X. J., et al. Adsorption of double-stranded DNA to graphene oxide preventing enzymatic digestion, *Nanoscale* 2011, 3, 3888-3892.
- [142] Zhang J. L., Zhang F., Yang H. J., et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization, *Langmuir* 2010, 26(9), 6083-6085.
- [143] Zhang F., Zheng B., Zhang J. L., et al. Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: physical properties and applications in phenolic compound removal, *Phys Chem C* 2010, 114(18), 8469-8473.
- [144] Lee D. Y., Khatun Z., Lee J. H., et al. *Blood compatible graphene/heparin conjugate through noncovalent chemistry*, *Biomacromolecules* 2011, 12(2), 336-341.
- [145] Dong H. F., Gao W. C., Yan F., et al. *Fluorescence resonance energy transfer between quantum dots and graphene oxide for sensing biomolecules*, *Anal Chem.* 2010, 82(13), 5511-5517.
- [146] Chen W. H., Yi P. W., Zhang Y., et al. *Composites of aminodextran-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and graphene oxide for cellular magnetic resonance imaging*, *ACS Appl Mater Interfaces* 2011, 3(10), 4085-4091.
- [147] Yang X. Y., Zhang X. Y., Liu Z. F., et al. *High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide*, *J Phys Chem C* 2008, 112(45), 17554-17558.
- [148] Depan D., Shah J., Misra R. D. K., *Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response*, *Mater Sci Eng C* 2011, 31(7), 1305-1312.
- [149] Zhang L. M., Xia J. G., Zhao Q. H., et al. *Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs*, *Small* 2010, 6(4), 537-544.
- [150] Andersson M., Lindegaard Madsen E., Overgaard M., et al. *Doxorubicin versus methotrexate both combined with cyclophosphamide, 5-fluorouracil and tamoxifen in postmenopausal patients with advanced breast cancer—a randomised study with more than 10 years follow-up from the danish breast cancer cooperative group*, *Eur J Cancer* 1999, 35(1), 39-46.
- [151] Gavrilov V., Steiner M., Shany S., *The combined treatment of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and a non-steroid anti-inflammatory drug is highly effective in suppressing prostate cancer cell line (LNCaP) growth*, *Anticancer Res.* 2005, 25(5), 3425-3429.
- [152] Rana V. K., Choi M. C., Kong J. Y., et al. *Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets*, *Macromol Mater Eng.* 2011, 296(2), 131-140.
- [153] Yang X. Y., Wang Y. S., Huang X., et al. *Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity*, *J Mater Chem.* 2011, 21(10), 3448-3454.
- [154] Yang Z. R., Wang H. F., Zhao J., et al. *Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy*, *Cancer Gene Ther.* 2007, 14, 599-615.

- [155] Naldini L., Blömer U., Gallay P., et al. *In Vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*, *Science* 1996, 272, 263-267.
- [156] Mintzer M. A., Simanek E. E., *Nonviral vectors for gene delivery*, *Chem Rev.* 2009, 109(2), 259-302.
- [157] Feng L. Z., Zhang S., Liu Z., *Graphene based gene transfection*, *Nanoscale* 2011, 3, 1252-1257.
- [158] Chen B., Liu M., Zhang L. M., et al. *Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector*, *J Mater Chem.* 2011, 21, 7736-7741.
- [159] Loh K. P., Bao Q. L., Eda G., et al. *Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications*, *Nat chem.* 2010, 2, 1015-1024.
- [160] Kovtyukhova N. I., Ollivier P. J., Martin B. R., et al. *Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations*, *Chem Mater.* 1999, 11, 771-778.
- [161] Bai H., Li C., Wang X. L., et al. *A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel*, *Chem Commun.* 2010, 46(14), 2376-2378.
- [162] Zhang L. M., Lu Z. X., Zhao Q. H., et al. *Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide*, *Small* 2011, 7(4), 460-464.
- [163] Yang K., Zhang S., Zhang G. X., et al. *Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy*, *Nano Lett.* 2010, 10(9), 3318-3323.
- [164] Markovic Z. M., Harhaji-Trajkovic L. M., Todorovic-Markovic B., et al. *In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes*, *Biomaterials* 2011, 32, 1121-1129.
- [165] Zhang W., Guo Z. Y., Huang D. Q., et al. *Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide*, *Biomaterials* 2011, 32(33), 8555-8561.
- [166] Huang P., Xu C., Lin J., et al. *Folic acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy*, *Theranostics* 2011, 1, 240-250.
- [167] Huang Z., Xu H. P., Meyers A. D., et al. *Photodynamic therapy for treatment of solid tumors- Potential and technical challenges*, *Technol Cancer Res T.* 2008, 7(4), 309-20.
- [168] Tian B., Wang C., Zhang S., et al. *Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide*, *ACS Nano* 2011, 5(9), 7000-7009.
- [169] Tang L. H., Wang Y., Li Y. M., et al. *Preparation, structure and electrochemical properties of graphene modified electrode*, *Adv Funct Mater.* 2009, 19(17), 2782-2789.
- [170] Wang Y., Shao Y. Y., Matson D. W., et al. *Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing*, *ACS Nano.* 2010, 4(4), 1790-1798.
- [171] Chang H. X., Tang L. H., Wang Y., et al. *Graphene fluorescence resonance energy transfer aptasensor for the thrombin detection*, *Anal Chem.* 2010, 82(6), 2341-2346.

- [172] Wang Y., Li Z. H., Hu D. H., et al. *Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells*, *J Am Chem Soc.* 2010, *132*(27), 9274-9276.
- [173] Tang L. H., Wang Y., Liu Y., et al. *DNA-directed self-assembly of graphene oxide with applications to ultrasensitive oligonucleotide assay*, *ACS Nano.* 2011, *5*(5), 3817-3822.
- [174] Dong X. L., Cheng J. S., Li J. H., et al. *Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS*, *Anal Chem.* 2010, *82*(14), 6208-6214.
- [175] Wang Y., Li Y. M., Tang L. H., et al. *Application of graphene modified electrode for selective detection of dopamine*, *Electrochem Commun.* 2009, *11*(4), 889-892.
- [176] He Q. Y., Sudibya H. G., Yin Z. Y., et al. *Centimeter-long and large-scale micropatterns of reduced graphene oxide films: fabrication and sensing applications*, *ACS Nano.* 2010, *4*(6), 3201-3208.
- [177] Zeng Q., Cheng J. S., Tang L. H., et al. *Self-assembled graphene enzyme hierarchical nanostructures for electrochemical biosensing*, *Adv Funct Mater.* 2010, *20*(19), 3366-3372.
- [178] Zhang Q., Wu S. Y., Zhang L., et al. *Fabrication of polymeric ionic liquid/graphene nanocomposite for glucose oxidase immobilization and direct electrochemistry*, *Biosensors & Bioelectronics* 2011, *26*(5), 2632-2637.
- [179] Wang Y., Zhang S., Du D., et al. *Self assembly of acetylcholines-terase on a gold nanoparticles-graphene nanosheet hybrid for organophosphate pesticide detection using polyelectrolyte as a linker*, *J Mater Chem.* 2011, *21*(14), 5319-5325.
- [180] Pan D. Y., Zhang J. C., Li Z., et al. *Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescent graphene quantum dots*, *Advan Mater.* 2010, *22*(6), 734-738.
- [181] Eda G., Lin Y. Y., Mattevi C., et al. *Blue photoluminescence from Chemically Derived Graphene Oxide*, *Adv Mater.* 2010, *22* (4), 505-509.
- [182] Mei Q. S., Zhang K., Guan G. J., et al. *Highly efficient photoluminescent graphene oxide with tunable surface properties*, *Chem Commun.* 2010, *46*(39), 7319-7319.
- [183] Yan X., Cui X., Li L. S., *Synthesis of large, stable colloidal graphene quantum dots with tunable size*, *J Am Chem Soc.* 2010, *132*(17), 5944-5945.
- [184] Zhu S. J., Zhang J. H., Qiao C. Y., et al. *Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging applications*, *Chem Commun.* 2011, *47*(24), 6858-6860.
- [185] Zhang L. M., Xing Y. D., He N. Y., et al. *Preparation of graphene quantum dots for bioimaging application*, *J of Nanosci Nanotechno*, accepted.
- [186] Shen J. H., Zhu Y. H., Chen C., et al. *Facile preparation and up-conversion luminescence of graphene quantum dots*, *Chem Commun.* 2011, *47*(9), 2580-2582.
- [187] Welsher K., Liu Z., Daranciang D., et al. *Selective probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near infrared fluorescent molecules*, *Nano Lett.* 2008, *8*(2), 586-590.
- [188] Sipkins D. A., Cheresch D. A., Kazemi M. R., et al. *Detection of tumor angiogenesis in vivo by  $\alpha v\beta 3$ -targeted magnetic resonance imaging*, *Nature Med.* 1998, *4*, 623-626.

- [189] Bonnemain B., *Superparamagnetic Agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications a review*, *J Drug Targeting* 1998, 6(3), 167-174
- [190] Akhavan O., Ghaderi E., *Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria*, *ACS Nano*. 2010, 4(10), 5731-5736.
- [191] Hu W. B., Peng C., Luo W. J., et al. *Graphene-based antibacterial paper*, *ACS Nano*. 2010, 4(7), 4317-4323.
- [192] Ryoo S. R., Kim Y. K., Kim M. H., et al. *Behaviors of NIH-3T3 fibro-blasts on graphene/carbon nanotubes: Proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies*, *ACS Nano*. 2010, 4(11), 6587-6598.
- [193] Fan H. L., Wang L. L., Zhao K. K., et al. *Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites*, *Biomacromolecules* 2010, 11(9), 2345-2351.
- [194] Nayak T. R., Andersen H., Makam V. S., et al. *Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*, *ACS Nano*. 2011, 5(6), 4670-4678.
- [195] Li N., Zhang X. M., Song Q., et al. *The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates*, *Biomaterials* 2011, 32(35), 9374-9382.
- [196] Zhang Y. B., Ali S. F., Dervishi E., et al. *Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells*, *ACS Nano*. 2010, 4(6), 3181-3186.
- [197] Chang Y. L., Yang S. T., Liu J. H., et al. *In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells*, *Toxicol Lett*. 2011, 200(3), 201-210.
- [198] Sasidharan A., Panchakarla L. S., Chandran P., et al. *Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene*, *Nanoscale* 2011, 3(6), 2461-2464.
- [199] Hu W. B., Peng C., Lv M., et al. *Protein corona-mediated mitigatory of Green Packaging tion of cytotoxicity of grapheme oxide*, *ACS Nano*. 2011, 5(5), and *Application of Biological Nanotechnology*, Hu-3693-3700.
- [200] Yang K., Wan J. M., Zhang S., et al. *In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice*, *ACS Nano*. 2011, 5(1), 516-522.
- [201] Zhang X. Y., Yin J. L., Peng C., et al. *Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration*, *Carbon* 2011, 49(3), 986-995.
- [202] Liao K. H., Lin Y. S., Macosko C. W., et al. *Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts*, *ACS Appl Mater Interfaces* 2011, 3(7), 2607-2615.
- [203] Feng L. Z., Liu Z., *Graphene in biomedicine: opportunities and challenges*, *Nanomedicine* 2011, 6(2), 317-324.
- [204] Ristic B. Z., Milenkovic M. M., Dakic I. R., Todorovic-Markovic B. M., Milosavljevic M. S., Budimir M. D., Paunovic V. G., Dramicanin M. D., Markovic Z. M., Trajkovic V.S., *Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots*, *Biomaterials*, 2014; 35, 4428-35. M21a.

- [205] Binnig G., Quate C. F., Gerber C., *Atomic force microscope*, *Phys Rev Lett.* 1986, 56, 930-933.
- [206] Čajdin D., *Mikroskopija Atomskim Silama (AFM)*, Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsek fizika eksperimentalni smer, Sarajevo, 2016.
- [207] Ni Z. H., Wang Y. Y., Yu T., Shen Z. X., *Raman Spectroscopy and Imaging of Graphene*, *Nano Res.* 2008, 1, 273-291.
- [208] Guo D., Xie G., Luo J., *Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications*, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 47 (2014) 013001.
- [209] Šimeg L., *Primjena elektronske mikroskopije u karakterizaciji prirodnih materijala*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2014.
- [210] Cardona M., *Light Scattering in Solids II*, Springer, Berlin 1982.
- [211] Kim Y., Jeong S., Jun B., Lee Yun-Sang, Lee Yoon-Sik, Jeong D.H., Lee D.S., *Endoscopic imaging using surface-enhanced Raman scattering*, *Eur. J. Nanomed.* 2017; DOI: 10.1515/ejnm-2017-0005, <https://doi.org/10.1515/ejnm-2017-0005>.
- [212] [www.ffh.bg.ac.rs/Dokumenti/Metode%20fha/2009/EPR-2006.doc](http://www.ffh.bg.ac.rs/Dokumenti/Metode%20fha/2009/EPR-2006.doc).
- [213] McNaught A. D., Wilkinson A., *Definition of electrokinetic potential in "IUPAC. Compendium of Chemical Terminology"*, 2nd ed. (the "Gold Book"); Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org>, 2006; Nic M., Jirat J., Kosata B.; Kompletiranje: Jenkins A. ISBN 0-9678550-9-8.doi:10.1351/goldbook.
- [214] Begić D., *Utvrdjivanje kvaliteta laboratorijski priređenih mikrokapsula mjerenjem fluorescencije i zeta potencijala*, Univerzitet u Sarajevu, Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku analitiku, Sarajevo, mart 2018.
- [215] Bhattacharjee S., *Review article, DLS and zeta potential - What they are and what they are not?* *Journal of Controlled Release*, Volume 235, 10 August 2016, Pages 337-351 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303832>.
- [216] Jiang J., Oberdörster G., Biswas P., *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. Nanoparticles And Occupational Health* June 2008, *Journal of Nanoparticle Research* January 2009, Volume 11, Issue 1, pp 77-89, <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-008-9446-4>.
- [217] Kirby B. J., *Micro and nanoscale fluid mechanics: Transport in microfluidic devices*. Cambridge University Press, Cambridge 2010, ISBN 978-0-521-11903-0. <http://www.kirbyresearch.com/textbook>.
- [218] Tošić D., *Doktorska disertacija: Sinteza i karakterizacija grafenskih nanotraka*, Univerzitet u Beogradu, Elektrotehnički fakultet, Beograd, 2016.
- [219] Živko T., *Određivanje antioksidativnog učinka ukupnih fenola i tanina u plodu rogača*, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 2012.
- [220] Jokanović V., *Fotoelektronska spektroskopija X-zraka*, Vinča Institute of Nuclear Sciences, Laboratory of Atomic Physic, University of Belgrade, 2014, ISBN 978-86-7306-123-8.

- [221] Marković Z. M., Budimir M. D., Kepić D. P., Holclajtner-Antunović I. D., Dramićanin M. D., Spasojević V. D., Peruško D. B., Špitalský Z., Mičušik M., Pavlović V. B., Todorović-Marković B. M., *Study of semi-transparent, conductive thin films of electrochemical exfoliated graphene*, *RSC Adv.* 2016, 6, 39275-39283.
- [222] Toolan D. T., Fujii S., Ebbens S. J., Nakamura Y., Howse J. R., *On the mechanisms of colloidal self-assembly during spin-coating*, *Soft Matter* 2014, 10, 8804-8812.
- [223] Pompeo G., Girasole M., Cricenti A., Cattaruzza F., Flamini A., Prospero T., Generosi J., Castellano A. C., *AFM characterization of solid-supported lipid multilayers prepared by spin-coating*, *Biochim Biophys Acta* 2005, 1712, 29-36.
- [224] Chitu L., Siffalovic P., Majkova E., Jergel M., Vegso K., Luby S., Capek I., Satka A., Perlich J., Timmann A., Roth S. V., Keckes J., Maier G. A., *Modified Langmuir-Blodgett Deposition of Nanoparticles - Measurement of 2D to 3D Ordered Arrays.*, *Meas. Sci. Rev.* 2010, 10, 162-165, DOI 10.2478/v10048-010-0028-0.
- [225] Stanković N. K., Todorović Marković B. M., Marković Z. M., *Self-assembly of carbon based nanoparticles films by Langmuir-Blodgett method*, *J. Serb. Chem. Soc.* 2020, impact factor = 0.828, DOI: 10.2298/JSC191225008S.
- [226] Nečas D., Klapetek P., *Gwyddion: An Open-source Software for SPM Data Analysis*. *Cent. Eur. J. Phys.* 2012, 10, 181-188, DOI 10.2478/s11534-011-0096-2.
- [227] [www.gwyddion.net](http://www.gwyddion.net). Version 2.42.
- [228] Nahar S.N., *Dissertation: Phase-separation characteristics of bitumen and their relation to damage-healing*, *Delft University of Technology*, 2016, ISBN 978-94-6186-598-4.
- [229] Tyagi A. K., Bukvički D., Gottardi D., Veljić M., Guerzoni M. E., Malik A., Marin P. D., *Antimicrobial potential and chemical characterization of serbian liverwort (porella arboris-vitae): sem and tem observation*, *Evid. Based Complement Altern. Med.* 2013, Available from: [https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/382927/abs/\(DOI:10.1155/2013/382927\)](https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/382927/abs/(DOI:10.1155/2013/382927)).
- [230] Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S. S., *Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts*, *J. Microbiol. Methods* 2010, 81, 121-126.
- [231] Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V., *Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (teatree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 1914-1920.
- [232] Schniepp H. C., Li J. L., McAllister M. J., Sai H., Herrera-Alonso M., Adamson D. H., Prud'homme R. K., Car R., Saville D. A., Aksay I. A., *Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide*, *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 8535-8539.
- [233] Akhavan O., *The effect of heat treatment on formation of graphene thin films from graphene oxide nanosheets*, *Carbon* 2010, 48, 509-519.
- [234] Chignell C. F., Krzysztof P. B., Reszka J., Motten A. G., Sik R. H., Dahl T. A., *Spectral and photochemical properties of curcumin*, *Photochem. Photobiol.* 1994, 59, 295-302.



- [235] Tønnesen H. H., de Vries H., Karlsen J., Henegouwen B. V., *Studies on curcumin and curcuminoids IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems*, *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 371-373.
- [236] Priyadarsini K. I., *Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells*, *J. Photochem. Photobiol. C* 2009, 10, 81-96.
- [237] Wyckoff R. W. G., *Crystal Structures*, John Wiley, New York, USA 1963.
- [238] Ricardo K. B., Sendecki A., Liu H., *Surfactant-free Exfoliation of Graphite in Aqueous Solutions*. *Chem. Comm.* 2014, 50, 2751-2754, DOI 10.1039/C3CC49273G.
- [239] Wang Y., Hu A., *Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications*, *J. Mater. Chem. C* 2014, 2, 6921-6939, DOI 10.1039/C4TC00988F.
- [240] Zhu S., Song Y., Zhao X., Shao J., Zhang J., Yang B., *The Photoluminescence Mechanism in Carbon Dots (Graphene quantum dots, Carbon nanodots, and Polymer dots): Current State and Future Perspective*, *Nano Res.* 2015, 8, 355-381, DOI 10.1007/s12274-014-0644-3.
- [241] Jovanović S. P., Marković Z. M., Syrgiannis Z., Dramićanin M. D., Arcudi F., La Parola V., Budimir M. D., Todorović Marković B. M., *Enhancing Photoluminescence of Graphene Quantum Dots by Thermal Annealing of the Graphite Precursor*, *Mater. Res. Bull.* 2017, 93, 183-193, DOI 10.1016/j.materresbull.2017.04.052.
- [242] Yang Y., Cui J., Zheng M., Hu C., Tan S., Xiao Y., Yang Q., Liu Y., *One-step Synthesis of Amino-functionalized Fluorescent Carbon Nanoparticles by Hydrothermal Carbonization of Chitosan*, *Chem. Comm.* 2012, 48, 380-382, DOI 10.1039/c1cc15678k.
- [243] Zong J., Yang X., Trinchi A., Hardin S., Cole I., Zhu Y., Li C., Muster T., Wei G., *Photoluminescence Enhancement of Carbon Dots by Gold Nanoparticles Conjugated via PAMAM Dendrimers*, *Nanoscale* 2013, 5, 11200-11206, DOI 10.1039/c3nr02527f.
- [244] Hsu P. C., Shih Z. Y., Lee C. H., Chang H. T., *Synthesis and Analytical Applications of Photoluminescent Carbon Nanodots*, *Green Chem.* 2012, 14, 917-920, DOI 10.1039/C2GC16451E.
- [245] McMurry J., *Organic Chemistry*, Brooks/Cole, USA 2000.
- [246] Nakanishi K., Solomon P. H., *Infrared Absorption Spectroscopy*, Holden-Day, Inc., San Francisco USA 1977.
- [247] Schmidt R., Seikel K., Brauer H. D., *Determination of the Phosphorescence Quantum Yield of Singlet Molecular-oxygen ( $^1\Delta_g$ ) in 5 Different Solvents*, *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 4507, DOI 10.1021/j100348a024.
- [248] Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B., *Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation*, *J. Phys. Chem. Reference Data* 1995, 24, 663, DOI 10.1063/1.555965.
- [249] Vegso K., Siffalovic P., Majkova E., Jergel M., Benkovicova M., Kocsis T., Weis M., Luby S., Nygard K., Konovalov O., *Nonequilibrium Phases of Nanoparticle Langmuir Films*, *Langmuir* 2012, 28, 10409-10414, DOI 10.1021/la301764t.

- [250] Doyle R. J., Rosenberg M., *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, in *American Society for Microbiology*, Washington DC 1990.
- [251] Notley S. M., Crawford R. J., Ivanova E. P., *In: Advances in Graphene Science; Aliofkhazraei M., Ed.; InTech. 2013; Chapter 5, pp 100-118. DOI 10.5772/56172.* Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-graphene-science/bacterial-interaction-with-graphene-particles-and-surfaces>, DOI 10.5772/56172.
- [252] Walker T., Canales M., Noimark S., Page K., Parkin I., Faull J., Bhatti M., Ciric L., *A Light Activated Antimicrobial Surface is Active against Bacterial, Viral and Fungal Organisms*, *Sci. Rep.* 2017, 7, 15298, DOI 10.1038/s41598-017-15565-5.
- [253] Mezirani M. J., Dong X., Zhu L., Jones L. P., LeCroy G. E., Yang F., Wang S., Wang P., Zhao Y., Yang L., Tripp R. A., Sun Y. P., *Visible-light-activated Bactericidal Functions of Carbon "Quantum" Dots*. *Appl. Mater & Interfaces* 2016, 8, 10761. DOI 10.1021/acsami.6b01765.
- [254] Felgentrager A., Maisch T., Spath A., Schroder J. A., Baumler W., *Singlet Oxygen Generation in Porphyrin-doped Polymeric Surface Coating Enables Antimicrobial Effects on Staphylococcus Aureus*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 20598, DOI 10.1039/c4cp02439g.
- [255] Tang L., Pillai S., Revsbech N. P., Schramm A., Bischoff C., Meyer R. L., *Biofilm Retention on Surfaces with Variable Roughness and Hydrophobicity*. *Biofouling* 2011, 27, 111-121, DOI 10.1080/08927014.2010.544848.
- [256] Ristić B., Milenković M., Dakić I., Todorović-Marković B., Milosavljević M., Budimir M., Paunović V., Dramićanin M., Marković Z., Trajković D., *Photodynamic Antibacterial Effect of Graphene Quantum Dots*. *Biomaterials* 2014, 35, 4428-4435, DOI 10.1016/j.biomaterials.2014.02.014.
- [257] Markovic Z. M., Ristic B. Z., Arskin K. M., Klisic Dj. G., Harhaji-Trajkovic Lj. M., Todorovic-Markovic B. M., Kepic D. P., Kravic-Stevovic T. K., Jovanovic S. P., Milenkovic M. M., Milivojevic D. D., Bumbasirevic V. Z., Dramicanin M. D., Trajkovic V. S., *Graphene Quantum Dots as Autophagy-inducing Photodynamic Agents*, *Biomaterials* 2012, 33, 7084-7092, DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.06.060.
- [258] Kim S. Y., Park J. W., *Cellular Defense against Singlet Oxygen-induced Oxidative Damage by Cytosolic NADP+-Dependent Isocitrate Dehydrogenase*, *Free Radic. Res.* 2003, 37, 309-316, DOI 10.1080/1071576021000050429.
- [259] Lushchak V., *Adaptive Response to Oxidative Stress: Bacteria, Fungi, Plants and Animals*, *Comp. Biochem. Phys. C* 2011, 153, 175-190, DOI 10.1016/j.cbpc.2010.10.004.
- [260] Marković Z. M., Kepić D. P., Matijašević D. M., Pavlović V. B., Jovanović S. P., Stanković N. K., Milivojević D. D., Spitalsky Z., Holclajtner-Antunović I. D., Bajuk-Bogdanović D. V., Nikšić M. P., Todorović-Marković B., *Ambient light induced antibacterial action of curcumin/graphene nanomesh hybrids*, *RSC Advances* 2017, 57(7), 36081-36092, impact factor = 3.1, DOI: 10.1039/C7RA05027E.
- [261] Stanković N. K., Bodik M., Šiffalović P., Kotlar M., Mičušik M., Špitalsky Z., Danko M., Milivojević D. D., Kleinova A., Kubat P., Capakova Z., Humpoliček P., Lehocky M., Todorović-Marković B. M., Marković\* Z. M., *Antibacterial and Antibiofouling Properties of Light Triggered Fluorescent Hydrophobic Carbon Quantum Dots Langmuir-Blodgett Thin Films*, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2018, impact factor = 5.9, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b04566.

## 9. Биографија аутора

Ненад Станковић је рођен 23. децембра 1964. године у Београду, где је са одличним успехом стекао основно образовање, а затим и средње у Математичкој гимназији “Вељко Влаховић”. Након одслуженог војног рока, започео је студије на Електротехничком факултету у Београду и успешно их окончао на одсеку и смеру Електронике. Његов дипломски рад „Побољшани Бернулијев метод за решавање диференцијалних алгебарских једначина” (ментор проф. др Добрило Тошић) и допринос примени Бернулијеве методе у анализи алгебарских једначина оцењен је оценом 10. Након редовних студија, уписао је постдипломске студије на Електротехничком факултету у Београду, на смеру “Дигитални пренос информација” и успешно одбранио магистарску тезу под називом „Анализа показатеља квалитета сервиса преноса говора преко Интернета” (ментор проф. др Милан Милосављевић).

У протеклих 28 година пословне каријере, Ненад Станковић је радио више различитих послова и имао више прилика да стечено образовање прошири и на друге области и сфере пословања. Свој први пословни ангажман реализовао је као технички консултант у приватној компанији DASTOBetel, да би се затим запослио у компанији Пупин Телеком ДКТС као инжењер функционалног испитивања дигиталних система и сарадник на пројекту увођења контроле квалитета и стандарда ISO 9001. Следећи пословни ангажман реализовао је у тадашњем Савезном министарству телекомуникација као самостални саветник у Одељењу за међународне послове, да би након извесног времена био постављен на место начелника истог Одељења, а затим касније и промовисан/постављен на место помоћника министра надлежног за међународне послове у области телекомуникација и поште. У више наврата предводио је или био члан државних делегација које су учествовале како на међународним конференцијама, тако и у раду различитих међувладиних комитета и радних група. Током рада у Министарству, предводио је тим који је сачинио више законских аката и прописа у области телекомуникација и поште, а као представник Савезне владе у својству предлагача закона, у више наврата учествовао је у раду Савезне скупштине СРЈ. Након рада у Савезној влади, провео је три године у Међународној унији за телекомуникације (ITU) у Женеви, као директор регионалне канцеларије за развој телекомуникација у Европи и бившим земљама Совјетског Савеза.

Током трогодишњег рада у ITU-у имплементирао је више десетина пројеката укључујући и захтеве за помоћ државама у развоју, организовао преко 30 међународних семинара/тренинга, као и активно представљао Унију на различитим конференцијама и саветовањима.

По повратку у Београд запослио се у представништву IBM-а у Београду, где је био задужен за промоцију Linux-а на територији Србије, Црне Горе и Македоније, укључујући и пружање активне подршке раду IBM Linux центра на Факултету организационих наука (ФОН) у Београду. Поред сарадње са софтверским компанијама, био је задужен и за промоцију IBM Академске иницијативе и сарадњу са универзитетима/факултетима и осталим академским институцијама. Од септембра 2007. до децембра 2010. године, Ненад Станковић је радио у IBM-овој регионалној канцеларији у Бечу као System Technology ISV регионални менаџер. Такође, као члан глобалног IBM универзитетског тима био је задужен за имплементацију IBM универзитетског програма у региону.

Од јануара 2011. године налази се на позицији представника Међународног центра за промоцију предузећа (ICPE) у Бечу. ICPE је међународна међувладинска организација са седиштем у Словенији, која се бави креирањем и имплементацијом програма/пројеката у различитим областима, са циљем развијања и унапређења људских ресурса. Као представник у Бечу посебно је задужен за сарадњу са међународним организацијама и финансијским институцијама лоцираним у Бечу и Женеви.

У том периоду као међународни експерт за област телекомуникација и ИТ-а регистрован у бази Међународне уније за телекомуникације (ITU), имплементирао је више пројеката од значаја за земље у развоју.

Поред својих редовних обавеза, почетком 2014. године успоставља нову сарадњу са Електротехничким факултетом у Београду (Катедра за микроелектронику и техничку физику), са Групом за физику и хемију угљеничних наноматеријала Института за нуклеарне науке „Винча“, као и са Електротехничким факултетом у Љубљани (Лабораторија за фотонапонске уређаје и оптоелектронику). Од почетка 2016. године сарадник је Полимерног института и Института за квантну физику Словачке академије наука у Братислави, где активно учествује у испитивањима и карактеризацији различитих хибридних угљеничних наноструктура.

Октобра 2016. године као магистар електротехничких наука уписује докторске студије на Модулу за нуклеарну, медицинску и еколошку технику Електротехничког факултета у Београду.

Током своје каријере, Ненад Станковић је написао и објавио више стручних чланака и публикација у домаћим и страним часописима.

## 10. Изјаве

*образац изјаве о ауторству*

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Ненад К. Станковић**

Број индекса: **5049/16**

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Микроскопска, спектроскопска и биомедицинска карактеризација  
хибридних угљеничних наноструктура**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 15.12.2021.



*образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада*

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског  
рада**

Име и презиме аутора: **Ненад К. Станковић**

Број индекса: **5049/16**

Студијски програм: **Нуклеарна, медицинска и еколошка техника**

Наслов рада: **Микроскопска, спектроскопска и биомедицинска карактеризација  
хибридних угљеничних наноструктура**

Ментори: **др Зоран Марковић и др Милан Тадић**

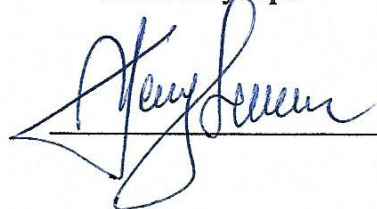
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 15.12.2021.

Потпис аутора





## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Микроскопска, спектроскопска и биомедицинска карактеризација  
хибридних угљеничних наноструктура**

---

која је моје ауторско дело.

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

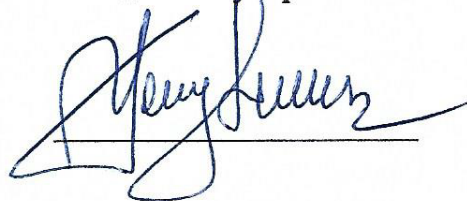
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 15.12.2021.

Потпис аутора



## Кратак опис лиценци

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.