

**UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET**



Nevena Radivojević

**Sinteza i karakterizacija nanomaterijala dobijenih korišćenjem
Saintpaulia ionantha, *Juglans regia* i *Allium sativum* za primenu u
tretmanu zagađenih voda**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY**



Nevena Radivojević

**Synthesis and characterization of nanomaterials obtained using
Saintpaulia ionantha, *Juglans regia*, and *Allium sativum* for application
in the treatment of contaminated water**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.

Mentori:

Dr Marija Gavrović Jankulović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vedran Milanković
Viši naučni saradnik
Insitut za nuklearne nauke „Vinča“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Aleksandar Popović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Marija Gavrović Jankulović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vedran Milanković
Viši naučni saradnik
Insitut za nuklearne nauke „Vinča“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Završetak doktorske disertacije za mene predstavlja mnogo više od završetka jednog akademskog procesa. Iza ovih stranica ostale su godine rada, učenja, odricanja, preispitivanja, promena i izazova. Bio je to put koji me je, pored nauke, mnogo naučio i o ljudima, odnosima, prijateljstvu, podršci i, možda najviše, o sopstvenoj snazi.

Najpre zahvaljujem dr Mariji Gavrović Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na mentorstvu i učešću u procesu izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem dr Aleksandru Popoviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i predsedniku komisije, na vremenu, pažnji i stručnom doprinosu ovom radu.

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru i prijatelju dr Vedranu Milankoviću, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Postoje ljudi koji se pojave u pravom trenutku i svojim prisustvom promene tok stvari. Nakon jednog posebno teškog perioda mog doktorskog puta, upravo je Vedran bio osoba koja je prva pružila ruku, ponudila pomoć i izašla sa idejom da mi bude mentor. Verovao je u ovaj rad i u mene onda kada mi je bilo teško da sama pronađem dovoljno vere da nastavim. Umeo je da prepozna potencijal ovog istraživanja, da ga oblikuje, usmeri i zajedno sa mnom dovede do njegovog kraja. Njegova podrška nikada nije bila samo stručna. Bila je ljudska, iskrena i pružena onda kada mi je bila najpotrebnija. Zato mu danas ne zahvaljujem samo kao mentoru, već i kao prijatelju. Vedrane, hvala ti što si verovao u mene i što si svojim znanjem, strpljenjem i prijateljstvom učinio da ovaj put ipak stigne do svog kraja. Neke zahvalnosti jednostavno ne mogu da stanu u nekoliko rečenica, ali ova je jedna od njih.

Hvala i našoj Milici Milanković, na podršci, razumevanju i prijateljstvu, ali i na tome što je tokom svih ovih godina bila oslonac i Vedranu i meni. Hvala ti što si razumela koliko nam je ovaj put bio važan, što si uvek znala kada je potrebno pružiti podršku, saslušati, ohrabriti ili jednostavno biti tu. Tvoja prisutnost, toplina i razumevanje bili su nam dragoceni u mnogim trenucima, a tvoje prijateljstvo jedan od onih tihih, ali važnih oslonaca koji ovaj put čine lakšim i lepšim.

Dr Andreji Leskovic, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, zahvaljujem na značajnom doprinosu biološkom delu istraživanja i stručnom znanju koje je utkano u ovaj rad. Njena uloga u realizaciji bioloških eksperimenata bila je važan deo ovog istraživanja.

Dr Sandri Petrović, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, zahvaljujem na doprinosu biološkom delu rada i pomoći tokom realizacije istraživanja.

Dr Tamari Lazarević-Pašti, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, zahvaljujem na stručnom doprinosu ovom radu, posebno na određivanju aktivnosti acetilholinesteraze, ali i na podršci koja je tokom ovog puta značila mnogo više od same profesionalne saradnje. Hvala Vam na spremnosti da pomognete, razumevanju, razgovorima i svakom trenutku kada je bilo potrebno ohrabrenje. Neke stvari koje nam ljudi pruže ne ostanu zabeležene u rezultatima i tabelama, ali zauvek ostanu deo puta kojim smo prošli.

Dr Igoru Paštiju, redovnom profesorom Fakulteta za Fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na doprinosu u realizaciji SEM, EDX i BET analiza, kao i na stručnom doprinosu ovom delu istraživanja.

Dr Vladimiru Rajiću zahvaljujem na stručnom doprinosu i pomoći u realizaciji SEM i EDX karakterizacije.

Dr Nebojši Potkonjaku, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, zahvaljujem na realizaciji i tumačenju analiza zeta potencijala i DLS-a, koje su predstavljale važan deo karakterizacije ispitivanog sistema.

Dr Jasmini Musović, istraživaču saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, zahvaljujem na doprinosu ICP analizama i pomoći u realizaciji ovog dela istraživanja.

Dr Tamari Terzić, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, zahvaljujem na saradnji, pomoći i podršci tokom izrade ovog rada. Ono što je počelo kao profesionalna saradnja vremenom je preraslo u iskreno prijateljstvo, a potom i u jedno od najlepših životnih kumstava. Hvala ti što si od saradnika postala prijatelj, a zatim i kuma - osoba koju danas ne vezujem samo za ovaj rad, već za jedan važan i dragocen deo svog života. Neke ljude nam u život dovede posao, a onda shvatimo da su postali mnogo više od kolega.

Posebno mesto u ovoj zahvalnici pripada mojoj kumi, dr Sanji Knežević Graovac, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Sanja je osoba zahvaljujući kojoj sam uopšte došla u Vinču i koja je od samog početka bila uz mene kroz različite faze mog profesionalnog i ličnog puta. Hvala ti što si otvorila vrata jednog važnog dela mog života, što si bila tu u svakoj situaciji, za svaki razgovor, savet, pomoć i podršku. Zahvaljujem ti i na doprinosu prilikom snimanja XRD analiza, zajedno sa Aleksom Lukovićem, ali još više na svemu onome što se ne može prikazati rezultatima, tabelama i grafikonima - na prijateljstvu, poverenju i osećaju da uvek postoji neko na koga mogu da računam. Neka od najvažnijih poznanstava u životu počnu sasvim slučajno. Neka ostanu prijateljstva. A neka postanu kumstva. Imala sam sreću da na ovom putu pronađem i jedno i drugo.

Posebnu zahvalnost dugujem svom bratu. Mom Marku. Hvala ti što si bio tu za mene, bez obzira na to koliko je bilo lako ili teško. Hvala ti za svaku podršku, razgovor, razumevanje i za ono jednostavno „tu sam“ koje nekada znači više od bilo kakvih velikih reči. Hvala ti što si bio moj oslonac onda kada mi je bio potreban i što nikada nisam morala da sumnjam da mogu da računam na tebe. Ovaj doktorat je rezultat mog rada, ali u njemu postoji i deo tvoje podrške, strpljenja i ljubavi.

Nataši i Nenadu, mojim roditeljima, zahvaljujem na svemu što su, na svoj način, utkali u moj život i što je doprinelo tome da danas budem osoba koja jesam.

Mom Monji zahvaljujem za sve ono što se možda ne vidi u ovoj disertaciji. Za godine tokom kojih je trebalo uskladiti posao, obaveze, porodicu i svakodnevni život. Za sve trenutke kada sam bila mislima u eksperimentima i rezultatima, dok je život kod kuće morao da teče dalje. Hvala ti za strpljenje, razumevanje, podršku i za sve ono što si preuzimao na sebe dok sam ja pokušavala da završim ovaj rad. Mom mužu dugujem zahvalnost i za to što nisam doktorirala pod svojim devojačkim prezimenom Arsenijević - tamo doktora nauka već ima, pa je red bio da se malo popravi stanje kod Radivojevića.

A onda dolaze moje najveće zahvalnosti. Mojoj Manji. Ti možda još dugo nećeš razumeti šta znači ova knjiga koja nosi ime tvoje mame. Ali jednog dana, kada budeš dovoljno velika da je pročitaš, volela bih da znaš da si bila jedan od mojih najvećih razloga da nastavim. Za svaki osmeh posle teškog dana. Za svaki zagrljaj koji je umeo da utiša sve ono što se dešavalo u mojoj glavi. Za to što si me, potpuno nesvesno, podsećala da postoji život izvan laboratorije, eksperimenata i svega što mi je u pojedinim trenucima delovalo ogromno. Dok sam ja završavala doktorat, ti si rasla pored mene. I dok sam privodila kraju ovaj rad, ti si me svakog dana učila šta zaista znači biti mama.

I mojoj maloj bebi koju sada nosim.

Na kraju, želim da kažem hvala svima koji su na bilo koji način bili deo ovog puta. Nekima za znanje. Nekima za pomoć. Nekima za prijateljstvo. Nekima za to što su bili tu onda kada je bilo najpotrebnije. A sebi - za to što nisam odustala.

SAŽETAK

Zagađenje vodenih sistema organskim i drugim toksičnim kontaminantima nameće potrebu za razvojem održivih pristupa koji povezuju racionalno korišćenje obnovljivih resursa sa dobijanjem funkcionalnih materijala za zaštitu životne sredine. Biljna biomasa u tom kontekstu predstavlja značajan izvor prirodnih redukcionih i stabilizacionih jedinjenja za zelenu sintezu metalnih nanočestica, ali istovremeno i obnovljivi prekursor za dobijanje poroznih ugljeničnih materijala. Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj integrisanog pristupa korišćenju biomase biljnih vrsta *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum*, zasnovanog na sukcesivnom iskorišćenju istog biljnog prekursora za dobijanje dve različite klase funkcionalnih materijala.

U prvom koraku, etanolni ekstrakti odabranih biljnih vrsta korišćeni su kao prirodni redukcion i stabilizacioni agensi za zelenu sintezu nanočestica srebra (AgNPs). Nakon ekstrakcije, preostali čvrsti deo istog biljnog materijala korišćen je kao prekursor za dobijanje ugljeničnih materijala karbonizacijom na 400 °C i 900 °C. Na taj način ista početna biomasa nije korišćena samo u jednom procesu, već je sukcesivno usmerena ka sintezi dve klase materijala različitih svojstava i potencijalnih primena, u skladu sa principima zelene hemije, cirkularne ekonomije i održivog razvoja. Ovakvo sukcesivno korišćenje iste biomase predstavlja osnovni koncept istraživanja.

Fizičko-hemijska karakterizacija AgNPs sprovedena je primenom UV-Vis spektroskopije, skenirajuće elektronske mikroskopije u kombinaciji sa energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom, rendgenske difrakcije analize, infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom, dinamičkog rasipanja svetlosti, merenja zeta potencijala i ICP-OES analize. Prisustvo karakterističnih maksimuma lokalizovane površinske plazmonske rezonance (eng. *Localized surface plasmon resonances* - LSPR maksimuma) u oblasti 400-415 nm i difrakcionih maksimuma karakterističnih za površinski centriranu kubnu strukturu metalnog srebra potvrdilo je uspešnu sintezu kristalnih AgNPs primenom sva tri biljna ekstrakta. Nanočestice su bile pretežno sferične, ali su se razlikovale u stepenu agregacije, hidrodinamičkoj veličini i koloidnoj stabilnosti. AS-Ag predstavljao je najfinije dispergovan i elektrostatistički najstabilniji sistem, dok je JR-Ag pokazao veću sklonost ka aglomeraciji. FTIR analizom potvrđeno je prisustvo biomolekula poreklom iz biljnih ekstrakata na površini AgNPs, što ukazuje da priroda biljnog prekursora utiče na formiranje njihovog površinskog biomolekulskog omotača.

Biološki efekti sintetisanih AgNPs ispitani su na humanim ćelijskim linijama normalnog i tumorskog porekla TK6, MRC-5, HeLa i A549. Analizirani su produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta, ćelijska vijabilnost i proliferacija, genotoksičnost primenom citokinezis-blok mikronukleus testa, proliferativni indeks, indukcija apoptoze i uticaj na aktivnost acetilholinesteraze. Dobijeni rezultati pokazali su da biološki odgovor značajno zavisi od biljnog prekursora korišćenog tokom sinteze, koncentracije nanočestica i ćelijskog modela. JR-Ag je na TK6 ćelijama pokazao najizraženiji citotoksični potencijal, SI-Ag je indukovao konzistentan koncentraciono-zavisani genotoksični i citostatski odgovor, dok je AS-Ag generalno ispoljavao blaže efekte. Sve tri vrste AgNPs indukovale su apoptozu, ali različitim intenzitetom i koncentracionim obrascem. Promene nivoa ROS nisu u svim sistemima neposredno pratile stepen citotoksičnosti ili apoptoze, što ukazuje na složenost mehanizama ćelijskog odgovora. Dodatno, SI-Ag i JR-Ag pokazali su snažan inhibitorni efekat prema AChE, dok je efekat AS-Ag bio znatno blaži.

U drugom delu istraživanja čvrsti ostaci istih biljnih prekursora koji su prethodno korišćeni za pripremu ekstrakata za sintezu AgNPs konvertovani su u ugljenične materijale. Karakterizacijom primenom SEM/EDX, FTIR, XRD, BET/NLDFT analize i merenja zeta potencijala pokazano je da temperatura karbonizacije ima ključan uticaj na razvoj njihove porozne strukture i površinskih svojstava. Povećanjem temperature sa 400 °C na 900 °C došlo je do izraženog povećanja specifične površine i zapremine pora i prelaska ka dominantno mikroporoznoj strukturi. Specifične površine SI900, JR900 i

AS900 iznosile su 295, 790 i 177 m² g⁻¹, redom, pri čemu je JR900 pokazao najizraženiji razvoj mikroporoznosti.

Adsorpciona svojstva ugljeničnih materijala ispitana su korišćenjem metilenskog plavog, rodamina B, kristalno ljubičastog i malahitno zelenog kao model katjonskih zagađujućih supstanci. Analizirani su uticaj pH vrednosti, temperature, koncentracije adsorbensa i vremena kontakta, kinetika i ravnoteža adsorpcije, kao i odnos između strukture adsorbensa i molekulskih karakteristika adsorbata. Materijali karbonizovani na 900 °C pokazali su generalno bržu kinetiku i veće adsorpcione kapacitete od odgovarajućih materijala dobijenih na 400 °C. Rezultati su pokazali da adsorpciona efikasnost nije određena samo specifičnom površinom, već i dostupnošću porozne mreže, efektivnim poprečnim presekom, trodimenzionalnom geometrijom i konformacionom fleksibilnošću adsorbata, kao i π - π , elektrostatičkim, hidrofobnim i disperzionim interakcijama i vodoničnim vezama. Adsorpcija ispitivanih boja bila je dominantno fizičke prirode.

Ponašanje odabranih ugljeničnih materijala dodatno je ispitano u dinamičkim uslovima kroz pet adsorpciono-desorpcionih ciklusa. Nakon adsorpcije, boje su desorbovane 50% rastvorom etanola, čime je omogućena regeneracija adsorbensa, njegova ponovna upotreba i izdvajanje adsorbovanih boja. SI900 se izdvojio kao najuniverzalniji materijal za višecikličnu primenu, dok je JR900 pokazao izrazitu selektivnost prema RB, za koji je postignuta praktično potpuna adsorpcija i gotovo kvantitativna regeneracija tokom ponovljenih ciklusa. Pokazano je da velika specifična površina i visoka početna adsorpciona efikasnost same po sebi nisu dovoljni pokazatelji praktične primenljivosti adsorbensa, već da je neophodno razmatrati i efikasnost desorpcije i očuvanje svojstava materijala tokom ponovljene upotrebe.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da se jedan isti biljni prekursor može sukcesivno koristiti kao izvor bioaktivnih komponenti za zelenu sintezu AgNPs i kao izvor ugljenika za dobijanje funkcionalnih adsorbenasa. Pri tome vrsta početne biomase značajno utiče na svojstva obe klase dobijenih materijala. Biljni prekursor, dakle, ne predstavlja samo polaznu sirovinu, već jedan od faktora koji određuju fizičko-hemijska i biološka svojstva AgNPs, kao i strukturna, adsorpciona i regeneraciona svojstva ugljeničnih materijala. Ovakav pristup omogućava potpunije iskorišćenje iste biomase i predstavlja osnovu za razvoj održivih funkcionalnih materijala za zaštitu životne sredine i druge ciljane primene.

Ključne reči: biomasa; zelena sinteza; nanočestice srebra; ugljenični materijali; katjonske boje; adsorpcija; regeneracija adsorbenasa; prečišćavanje voda.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

ABSTRACT

Contamination of aquatic systems with organic and other toxic pollutants creates a need for the development of sustainable approaches that combine the rational use of renewable resources with the production of functional materials for environmental protection. In this context, plant biomass represents an important source of natural reducing and stabilizing compounds for the green synthesis of metal nanoparticles, while simultaneously serving as a renewable precursor for the production of porous carbon materials. The aim of this doctoral dissertation was to develop an integrated approach to the utilization of biomass from *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia*, and *Allium sativum*, based on the sequential use of the same plant precursor for the production of two different classes of functional materials.

In the first step, ethanolic extracts of the selected plant species were used as natural reducing and stabilizing agents for the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs). Following extraction, the remaining solid fraction of the same plant material was used as a precursor for the preparation of carbon materials by carbonization at 400 °C and 900 °C. Thus, the same initial biomass was not used in a single process only, but was sequentially directed toward the synthesis of two classes of materials with different properties and potential applications, in accordance with the principles of green chemistry, the circular economy, and sustainable development. This sequential utilization of the same biomass represents the central concept of the research.

The physicochemical characterization of AgNPs was performed using UV–Vis spectroscopy, scanning electron microscopy coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy, X-ray diffraction, Fourier-transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering, zeta-potential measurements, and ICP-OES analysis. The presence of characteristic Localized surface plasmon resonances - LSPR maxima in the 400–415 nm region and diffraction peaks characteristic of the face-centered cubic structure of metallic silver confirmed the successful synthesis of crystalline AgNPs using all three plant extracts. The nanoparticles were predominantly spherical, but differed in their degree of aggregation, hydrodynamic size, and colloidal stability. AS-Ag represented the most finely dispersed and electrostatically most stable system, whereas JR-Ag showed a greater tendency toward agglomeration. FTIR analysis confirmed the presence of plant-derived biomolecules on the surface of the AgNPs, indicating that the nature of the plant precursor influences the formation of their surface biomolecular coating.

The biological effects of the synthesized AgNPs were investigated using human cell lines of normal and tumor origin, namely TK6, MRC-5, HeLa, and A549. Reactive oxygen species production, cell viability and proliferation, genotoxicity using the cytokinesis-block micronucleus assay, proliferation index, induction of apoptosis, and effects on acetylcholinesterase activity were evaluated. The obtained results showed that the biological response strongly depended on the plant precursor used during synthesis, nanoparticle concentration, and the cell model. JR-Ag exhibited the most pronounced cytotoxic potential toward TK6 cells, SI-Ag induced a consistent concentration-dependent genotoxic and cytostatic response, whereas AS-Ag generally exerted milder effects. All three types of AgNPs induced apoptosis, although with different intensities and concentration-dependent patterns. Changes in ROS levels did not directly parallel the degree of cytotoxicity or apoptosis in all systems, indicating the complexity of the cellular response mechanisms. In addition, SI-Ag and JR-Ag exhibited pronounced inhibitory effects on AChE, whereas the effect of AS-Ag was considerably weaker.

In the second part of the study, the solid residues of the same plant precursors previously used for the preparation of extracts for AgNP synthesis were converted into carbon materials. Characterization by SEM/EDX, FTIR, XRD, BET/NLDFT analysis, and zeta-potential measurements demonstrated that carbonization temperature had a crucial influence on the development of their porous structure and surface properties. Increasing the temperature from 400 °C to 900 °C resulted in a pronounced increase in specific surface area and pore volume and a transition toward a predominantly microporous structure.

The specific surface areas of SI900, JR900, and AS900 were 295, 790, and 177 m² g⁻¹, respectively, with JR900 exhibiting the most pronounced development of microporosity.

The adsorption properties of the carbon materials were investigated using Methylene Blue, Rhodamine B, Crystal Violet, and Malachite Green as model cationic pollutants. The effects of pH, temperature, adsorbent concentration, and contact time were analyzed, together with adsorption kinetics and equilibrium, as well as the relationship between adsorbent structure and the molecular characteristics of the adsorbates. Materials carbonized at 900 °C generally exhibited faster adsorption kinetics and higher adsorption capacities than the corresponding materials obtained at 400 °C. The results demonstrated that adsorption efficiency was determined not only by specific surface area, but also by the accessibility of the porous network, the effective molecular cross-section, three-dimensional geometry, and conformational flexibility of the adsorbates, as well as by π - π , electrostatic, hydrophobic, and dispersion interactions and hydrogen bonding. The adsorption of the investigated dyes was predominantly physical in nature.

The performance of selected carbon materials was further evaluated under dynamic conditions over five adsorption-desorption cycles. Following adsorption, the dyes were desorbed using a 50% ethanol solution, enabling regeneration of the adsorbent, its reuse, and recovery of the adsorbed dyes. SI900 was identified as the most versatile material for repeated-cycle application, whereas JR900 exhibited pronounced selectivity toward RB, for which practically complete adsorption and nearly quantitative regeneration were achieved throughout repeated cycles. The results demonstrated that a large specific surface area and high initial adsorption efficiency alone are not sufficient indicators of the practical applicability of an adsorbent; desorption efficiency and preservation of material properties during repeated use must also be taken into account.

The results of this doctoral dissertation demonstrate that the same plant precursor can be sequentially used as a source of bioactive components for the green synthesis of AgNPs and as a carbon source for the preparation of functional adsorbents. At the same time, the type of initial biomass significantly influences the properties of both classes of materials obtained. Therefore, the plant precursor does not merely represent a starting raw material, but also constitutes one of the factors determining the physicochemical and biological properties of AgNPs, as well as the structural, adsorption, and regeneration properties of the corresponding carbon materials. This approach enables more complete utilization of the same biomass and provides a basis for the development of sustainable functional materials for environmental protection and other targeted applications.

Keywords: biomass; green synthesis; silver nanoparticles; carbon materials; cationic dyes; adsorption; regeneration; water treatment

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKE OSNOVE	3
2.1. Nanomaterijali i njihov značaj u savremenoj nauci i tehnologiji	3
2.2. Održivi i ekološki prihvatljivi pristupi sintezi nanomaterijala.....	4
2.3. Srebrne nanočestice.....	6
2.3.1. Biljni materijali u zelenoj sintezi srebrnih nanočestica	7
2.3.2. Biohemijski efekti srebrnih nanočestica	8
2.3.2.1. Citotoksični i genotoksični efekti	9
2.3.2.2. Oksidativni stres i indukcija apoptoze	12
2.3.2.3. Uticaj na aktivnost acetilholinesteraze	14
2.4. Ugljenični materijali.....	15
2.4.1. Ugljenični materijali dobijeni karbonizacijom biomase	17
2.4.2. Uticaj uslova karbonizacije na strukturu i svojstva materijala.....	19
2.4.3. Primena ugljeničnih materijala dobijenih karbonizacijom biomase u zaštiti životne sredine	20
2.4.4. Katjonske boje kao zagađivači vodenih sistema	22
2.4.4.1. Metode uklanjanja katjonskih boja iz vodenih sistema.....	24
2.5. Adsorpcija na čvrstu površinu	26
2.5.1. Kinetika adsorpcije	26
2.5.2. Adsorpcione izoterme	28
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I STRUKTURA DOKTRSKJE DISERTACIJE	30
4. EKSPERIMENTALNI DEO	32
4.1. Materijal	32
4.1.1. Priprema etanolnih ekstrakata	32
4.1.2. Zelena sinteza srebrnih nanočestica.....	32
4.1.3. Sinteza ugljeničnih materijala karbonizacijom biljnih ostataka	32
4.2. Metode.....	33
4.2.1. Karakterizacija srebrnih nanočestica	33
4.2.2. Ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog potencijala sintetisanih nanočestica.....	33
4.2.2.1. Kultivacija i priprema ćelijskih linija	33
4.2.2.2. Priprema suspenzija nanočestica srebra i tretman ćelija.....	34
4.2.2.3. Citokinezis-blok mikronukleus test i određivanje citokinezis-blok proliferativnog indeksa	35
4.2.2.4. Analiza apoptoze i ćelijskog ciklusa	36

4.2.2.5.	<i>Testovi citotoksičnosti</i>	36
4.2.2.6.	<i>Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika</i>	38
4.2.2.7.	<i>Ispitivanje uticaja srebrnih nanočestica na aktivnost acetilholinesteraze</i>	38
4.2.2.8.	<i>Statistička analiza podataka</i>	39
4.2.3.	Karakterizacija ugljeničnih materijala	39
4.2.4.	Adsorpcioni eksperimenti	40
4.2.4.1.	<i>Adsorpcija pri stacionarnim uslovima</i>	40
4.2.4.2.	<i>Adsorpcija pri dinamičkim uslovima, regeneracija i ponovna upotreba</i>	41
4.2.5.	Izračunavanje molekulskih dimenzija	41
4.2.6.	Ostala korišćena oprema	41
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	42
5.1.	Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih nanočestica srebra	42
5.2.	Biohemijski efekti nanočestica srebra	48
5.2.1.	Ispitivanje uticaja na ćelijsku liniju TK6	48
5.2.1.1.	<i>Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika</i>	48
5.2.1.2.	<i>Citokinezis-blok mikronukleus test i analiza citokinezis-blok proliferativnog indeksa</i>	50
5.2.1.3.	<i>Ispitivanje citotoksičnosti primenom ABCAM testa</i>	56
5.2.1.4.	<i>Indukcija apoptoze</i>	59
5.2.2.	Ispitivanje uticaja na adherentne ćelije	62
5.2.2.1.	<i>Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika</i>	62
5.2.2.2.	<i>Ispitivanje citotoksičnosti primenom ABCAM testa</i>	68
5.2.2.3.	<i>Ispitivanje citotoksičnosti primenom sulforodamin B testa</i>	74
5.2.3.	Uticaj na aktivnost acetilholinesteraze	80
5.3.	Fizičko-hemijska karakterizacija ugljeničnih materijala	84
5.4.	Adsorpcija katjonskih boja na sintetisane materijale	91
5.4.1.	Ispitivanje uslova adsorpcije	91
5.4.2.	Ispitivanje kinetike adsorpcije katjonskih boja na izabrane materijale	96
5.4.3.	Izotermne studije i mehanizmi adsorpcije katjonskih boja na izabranim ugljeničnim materijalima	102
5.4.4.	Adsorpcija katjonskih boja pri dinamičkim uslovima, regeneracija i ponovna upotreba	111
6.	ZAKLJUČAK	116
	LITERATURA	119
	PRILOZI	135

1. UVOD

Savremeni razvoj nauke i tehnologije karakteriše intenzivna primena nanomaterijala u različitim oblastima, uključujući biohemiju, nauku o materijalima, farmaciju i zaštitu životne sredine. Nanotehnologija, kao izrazito interdisciplinarno polje koje objedinjuje hemiju, fiziku, biologiju, biohemiju i inženjerstvo, omogućila je dizajniranje materijala sa jedinstvenim fizičko-hemijskim i biološkim svojstvima, koja se značajno razlikuju od osobina njihovih makroskopskih ekvivalenata. Međutim, uprkos velikom potencijalu nanomaterijala, konvencionalne metode njihove sinteze često uključuju upotrebu toksičnih reagensa, visoku potrošnju energije i generisanje opasnog otpada, što je u suprotnosti sa principima održivog razvoja i zelene hemije [1].

U tom kontekstu, poslednjih godina raste interesovanje za razvoj ekološki prihvatljivih metoda sinteze nanomaterijala, zasnovanih na korišćenju prirodnih resursa kao alternativnih redukcionih i stabilizacionih agenasa. Zelena sinteza nanomaterijala predstavlja održiv pristup koji integriše principe zelene hemije, smanjuje negativan uticaj na životnu sredinu i istovremeno omogućava dobijanje biokompatibilnih i funkcionalno unapređenih materijala [2]. Posebnu pažnju privlači primena biljnih ekstrakata, bogatih biološki aktivnim jedinjenjima kao što su polifenoli, flavonoidi, alkaloidi, terpenoidi i sumporna jedinjenja, koja mogu delovati kao reduktori metalnih jona, ali i kao stabilizatori formiranih nanočestica [3].

Srebrne nanočestice (AgNPs) spadaju među najintenzivnije istraživane metalne nanomaterijale, pre svega zbog izraženih antimikrobnih, antioksidativnih i antikancerogenih svojstava. Njihova primena obuhvata širok spektar oblasti, uključujući biomedicinske materijale, farmaceutske formulacije, biosenzore, dezinfekciona sredstva i sisteme za tretman voda [4, 5]. Biološka aktivnost AgNPs u velikoj meri zavisi od njihove veličine, morfologije, površinske reaktivnosti i stabilnosti, što dodatno naglašava značaj pažljivo kontrolisane sinteze, kao i detaljne fizičko-hemijske i biohemijske karakterizacije. Zelena sinteza AgNPs korišćenjem biljnih ekstrakata omogućava dobijanje nanočestica sa modifikovanom površinom, što može doprineti poboljšanoj biološkoj aktivnosti i smanjenoj toksičnosti u poređenju sa nanočesticama sintetisanim konvencionalnim metodama [6].

U okviru ove doktorske disertacije, za zelenu sintezu AgNPs odabrane su biljne vrste *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum*. Ove biljke odlikuje bogat i raznovrstan biohemijski sastav, koji uključuje fenolna jedinjenja, flavonoide, tanine i sumporna jedinjenja, odgovorna za izraženu redukcionu sposobnost i biološku aktivnost [7, 8]. Dodatna prednost odabranih biljnih materijala ogleda se u njihovoj dostupnosti, održivosti i potencijalu za višestruku primenu, kako u sintezi metalnih nanočestica, tako i u dobijanju ugljeničnih materijala iz čvrstih ostataka nakon ekstrakcije.

Biološka evaluacija sintetisanih AgNPs predstavlja ključni korak u proceni njihove potencijalne primene u biohemiji, nauci o materijalima i farmaciji. Interakcija nanočestica sa ćelijskim strukturama može dovesti do indukcije oksidativnog stresa, oštećenja DNK, poremećaja ćelijskog ciklusa i aktivacije apoptotskih puteva, ali se u zavisnosti od njihovog sastava, površinskih karakteristika, primenjene koncentracije i tipa ćelija ne može isključiti ni mogućnost citoprotektivnog delovanja. Takav efekat može biti povezan sa prisustvom bioaktivnih jedinjenja zaostalih iz biljnih ekstrakata korišćenih u zelenoj sintezi, kao i sa sposobnošću pojedinih nanočestičnih sistema da modulišu oksidativni status ćelija. Posebno je značajno ispitivanje selektivne toksičnosti prema malignim u odnosu na zdrave ćelijske linije. Pored toga, sve izraženija zabrinutost u vezi sa potencijalnim neurotoksičnim efektima metalnih nanočestica ukazuje na potrebu za ispitivanjem njihovog uticaja na enzimske sisteme, poput acetilholinesteraze, koji imaju ključnu ulogu u funkcionisanju nervnog sistema.

Pored sinteze AgNPs, ova disertacija obuhvata i istraživanje održivih ugljeničnih materijala dobijenih karbonizacijom čvrstih biljnih ostataka navedenih biljnih vrsta. Biomasa biljnog porekla predstavlja

obnovljiv i ekološki prihvatljiv izvor ugljenika, a njena termička konverzija u inertnoj atmosferi omogućava dobijanje poroznih ugljeničnih materijala sa razvijenom specifičnom površinom i prisutnim površinskim funkcionalnim grupama [9]. Temperatura karbonizacije ima ključan uticaj na strukturu i svojstva dobijenih materijala, pri čemu niže temperature favorizuju očuvanje funkcionalnih grupa, dok više temperature dovode do povećane aromatičnosti i razvijenije poroznosti [10].

Ugljenični materijali dobijeni iz biomase u poslednje vreme privlače značajnu pažnju kao potencijalni adsorbensi za uklanjanje zagađivača iz vodenih sredina [11]. Posebno su problematične katjonske boje koje se široko koriste u tekstilnoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, a koje su često toksične, mutagene i teško biorazgradive [12]. Metilensko plavo (eng. *Methylene blue* - MB), rodamin B (eng. *Rhodamine B* - RB), kristalno ljubičasto (eng. *Crystal Violet* - CV) i malahitno zeleno (eng. *Malachite green* - MG) predstavljaju tipične predstavnike ove grupe zagađivača i često se koriste kao model sistemi u ispitivanju adsorpcionih procesa. Razvoj efikasnih, ekonomičnih i regenerabilnih adsorbenasa od ključnog je značaja za unapređenje tehnologija za tretman otpadnih voda.

Poseban doprinos ove disertacije ogleda se u konceptu potpunog iskorišćenja početne biomase, pri čemu se isti biljni materijal koristi kako za sintezu AgNPs, tako i za dobijanje ugljeničnih materijala iz čvrstih ostataka nakon ekstrakcije. Na taj način se minimizira generisanje otpada i ostvaruje racionalno upravljanje resursima u skladu sa principima cirkularne ekonomije. Dodatno, razvijeni ugljenični materijali pokazuju potencijal za efikasno uklanjanje katjonskih boja iz vodenih sistema, uz mogućnost njihove regeneracije i ponovne upotrebe. Istovremeno, ispitivanja ukazuju i na mogućnost ponovne upotrebe uklonjenih boja, čime se dodatno doprinosi smanjenju ukupnog ekološkog opterećenja.

Uprkos velikom broju studija posvećenih zelenoj sintezi AgNPs i razvoju ugljeničnih adsorbenasa, u naučnoj literaturi i dalje postoji nedostatak integrisanih istraživanja koja koriste iste biljne izvore za dobijanje različitih funkcionalnih materijala sa primenom u biohemiji i zaštiti životne sredine. Ova disertacija ima za cilj da popuni navedeni naučni jaz kroz interdisciplinarni pristup koji povezuje zelenu sintezu AgNPs, njihovu detaljnu fizičko-hemijsku i biohemijsku karakterizaciju, kao i valorizaciju biljnih ostataka kroz sintezu ugljeničnih materijala za uklanjanje zagađivača iz vodenih sistema.

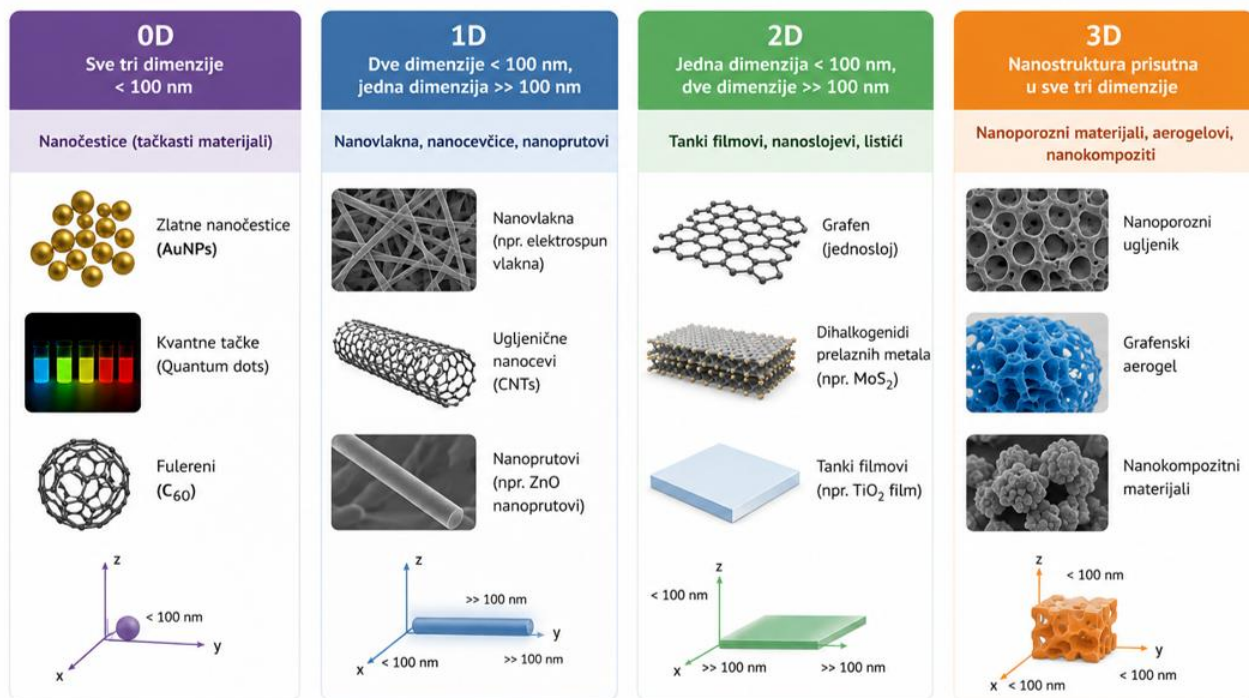
Na taj način, rad doprinosi razvoju održivih nanomaterijala zasnovanih na principima zelene hemije i cirkularne ekonomije, u skladu sa ciljevima održivog razvoja Ujedinjenih nacija (eng. *Sustainable Development Goals* – SDGs), posebno SDG 6, SDG 12 i SDG 13 [13]. Poseban značaj ima SDG 6, koji se odnosi na dostupnost čiste vode i održivo upravljanje vodnim resursima, budući da je primena sintetisanih materijala usmerena ka tretmanu zagađenih voda i smanjenju prisustva kontaminanata u vodenim sistemima. Istovremeno, valorizacija biootpada i potpuno iskorišćenje biomase povezani su sa SDG 12, odnosno odgovornom proizvodnjom i potrošnjom, dok smanjenje upotrebe agresivnih hemikalija i energetski zahtevnih postupaka doprinosi principima SDG 13, koji se odnosi na klimatsku akciju. Time se pruža naučna osnova za potencijalnu primenu ovih materijala u biohemiji, nauci o materijalima i zaštiti životne sredine.

2. TEORIJSKE OSNOVE

2.1. Nanomaterijali i njihov značaj u savremenoj nauci i tehnologiji

Razvoj savremene nauke o materijalima u velikoj meri zasniva se na mogućnosti kontrole strukture, sastava i svojstava materijala na sve manjim prostornim skalama. Posebno mesto u tom kontekstu zauzimaju nanomaterijali, odnosno materijali kod kojih je najmanje jedna dimenzija u nanometarskom opsegu, najčešće manja od 100 nm [14].

Nanomaterijali se mogu klasifikovati prema broju dimenzija koje se nalaze u nanometarskom opsegu (Slika 1). Nulodimenzioni (0D) nanomaterijali imaju sve dimenzije manje od 100 nm i najčešće se javljaju u obliku sfernih ili približno sfernih nanočestica. U ovu grupu ubrajaju se, između ostalog, kvantne tačke i fulereni. Kod jednodimenzionih (1D) nanomaterijala dve dimenzije su u nanometarskom opsegu, dok je treća znatno izraženija, zbog čega ovi materijali imaju izdužen oblik. Tipični predstavnici su nanovlakna, nanoprutovi i ugljenične nanocevi. Dvodimenzioni (2D) nanomaterijali karakterišu se jednom dimenzijom manjom od 100 nm, dok su druge dve dimenzije značajno razvijenije. U ovu grupu spadaju tanki filmovi, nanoslojevi i grafenski materijali. Trodimenzioni (3D) nanomaterijali predstavljaju kompleksne sisteme kod kojih je nanostruktura prisutna kroz čitav materijal, pri čemu se sastoje od međusobno povezanih nanoskalnih jedinica. Primer ovakvih sistema su nanoporozni materijali i određeni nanokompoziti [15].



Slika 1. Klasifikacija nanomaterijala prema dimenzionalnosti

Jedna od najvažnijih karakteristika nanomaterijala jeste izrazito razvijena specifična površina, zbog čega veliki broj atoma ili molekula postaje dostupan za interakciju sa okolinom. Kao posledica toga, nanomaterijali često pokazuju povećanu hemijsku reaktivnost, poboljšana adsorpciona svojstva i drugačije elektronsko ponašanje u odnosu na konvencionalne materijale. Njihova svojstva dodatno

zavise od veličine čestica, oblika, morfologije i prisustva površinskih funkcionalnih grupa, što omogućava ciljanu modifikaciju i prilagođavanje određenoj primeni [16].

Zahvaljujući ovakvim karakteristikama, nanomaterijali danas imaju veoma široku primenu u različitim oblastima nauke i tehnologije. U savremenoj elektronici koriste se za proizvodnju senzora, provodnih filmova, tranzistora i optoelektronskih komponenti [15]. U oblasti energetike značajni su za razvoj baterija, superkondenzatora, gorivnih ćelija i solarnih sistema, gde razvijena površina i efikasniji transport naelektrisanja omogućavaju unapređenje performansi uređaja [17].

Pored tehnoloških primena, nanomaterijali imaju veoma važnu ulogu u biomedicini. Njihova mala veličina i mogućnost funkcionalizacije površine omogućavaju interakciju sa biomolekulima, ćelijama i tkivima ~~na molekulskom nivou~~. Zbog toga se koriste kao nosači lekova, biosenzori i kao kontrastna sredstva u dijagnostičkim metodama [18-20]. Poseban značaj imaju sistemi za kontrolisano oslobađanje aktivnih supstanci, jer omogućavaju povećanje efikasnosti terapije i smanjenje neželjenih efekata [21]. Pored toga, određeni metalni i ugljenični nanomaterijali pokazuju izražena antimikrobna svojstva, zbog čega se istražuju za primenu u razvoju novih biomaterijala i zaštitnih prevlaka [22].

Značajna primena nanomaterijala prisutna je i u oblasti zaštite životne sredine. Zbog velike specifične površine i mogućnosti modifikacije hemijske površine, nanomaterijali se koriste za uklanjanje različitih zagađivača iz vode i vazduha [16]. Posebno se ispituje njihova primena u adsorpciji organskih mikropolutanata [23], boja [24], pesticida [25], farmaceutskih ostataka [26] i jona teških metala [27]. Pored adsorpcionih procesa, određeni nanomaterijali koriste se i kao katalizatori u procesima degradacije zagađivača, uključujući fotokatalitičke i oksidacione procese [28]. Nanostrukturni ugljenični materijali, metalni oksidi i kompozitni sistemi izdvajaju se kao posebno perspektivni zbog kombinacije visoke reaktivnosti, hemijske stabilnosti i mogućnosti regeneracije [29].

Važno je naglasiti da se značaj nanomaterijala ne može svesti samo na njihove male dimenzije. Ključna prednost ovih materijala ogleda se u mogućnosti da se promenom veličine, oblika, poroznosti, kristaliničnosti i hemijskog sastava površine ciljano utiče na njihovo ponašanje u konkretnom sistemu [30]. Na taj način se uspostavlja direktna veza između načina sinteze, strukture materijala i njihove funkcionalnosti. Upravo ova mogućnost projektovanja svojstava čini nanomaterijale posebno značajnim za razvoj adsorbenasa, katalizatora, senzora i biomedicinskih sistema [31].

Na osnovu navedenog, može se zaključiti da nanomaterijali predstavljaju jednu od najznačajnijih grupa funkcionalnih materijala savremenog doba. Mogućnost kontrole njihove strukture i svojstava na nanoskalnom nivou omogućava razvoj materijala prilagođenih različitim tehnološkim, biomedicinskim i ekološkim primenama, zbog čega oblast nanomaterijala i dalje predstavlja jedan od najintenzivnije razvijanih pravaca savremene nauke.

2.2. Održivi i ekološki prihvatljivi pristupi sintezi nanomaterijala

Intenzivan razvoj nanotehnologije i sve šira primena nanomaterijala doveli su do potrebe za razvojem održivijih metoda njihove sinteze. Iako konvencionalni postupci često omogućavaju dobru kontrolu veličine i morfologije nanočestica, veliki broj ovih metoda zasniva se na upotrebi toksičnih hemikalija, visokim temperaturama, velikoj potrošnji energije i generisanju značajnih količina otpada [32]. Zbog toga se posebna pažnja usmerava ka razvoju ekološki prihvatljivih pristupa koji omogućavaju dobijanje funkcionalnih nanomaterijala uz manji negativan uticaj na životnu sredinu [33].

Održivi pristupi sintezi nanomaterijala zasnivaju se na principima zelene hemije, čiji je osnovni cilj smanjenje upotrebe opasnih supstanci i minimizacija nastanka štetnih nusprodukata tokom procesa sinteze [33]. U tom kontekstu, nastoji se da se agresivni redukcion i stabilizacioni agensi zamene manje toksičnim ili prirodnim alternativama. U konvencionalnoj sintezi AgNPs često se koriste jaki redukcion i agensi, kao što su natrijum-borohidrid, hidrazin, formaldehid ili etilen-glikol, dok se za stabilizaciju

mogu primenjivati sintetički surfaktanti i polimeri, poput cetiltrimetilamonijum-bromida (CTAB), natrijum-dodecil-sulfata (SDS) ili polivinilpirolidona (PVP). Iako ovi reagensi mogu omogućiti dobru kontrolu veličine i stabilnosti nanočestica, njihova upotreba povećava hemijsko opterećenje procesa i zahteva dodatno uklanjanje ili tretman zaostalih supstanci. Zbog toga se prednost daje procesima koji se odvijaju pri blažim uslovima, odnosno pri nižim temperaturama i uz manju potrošnju energije. Pored smanjenja ekološkog opterećenja, ovakav pristup često doprinosi i većoj bezbednosti rada i jednostavnijem upravljanju otpadom [34, 35].

Poseban značaj održivih pristupa ogleda se u mogućnosti korišćenja obnovljivih sirovina i biootpada kao prekursora za sintezu nanomaterijala. Biljni ekstrakti [36], mikroorganizmi [37] i različiti oblici biomase mogu sadržati jedinjenja sposobna da učestvuju u redukciji metalnih jona i stabilizaciji nastalih nanočestica. Na taj način, prirodni materijali istovremeno preuzimaju ulogu redukcionih i stabilizacionih agenasa, čime se smanjuje potreba za dodatnim hemikalijama. Istovremeno, korišćenje biootpada doprinosi njegovoj valorizaciji i ponovnom uključivanju u proizvodne tokove, čime se koncept otpada delimično transformiše u koncept sekundarne sirovine [38].

Za razliku od konvencionalnih metoda, koje često podrazumevaju višestepene procese i veliku količinu hemijskog otpada, zeleni pristupi omogućavaju jednostavniju i ekonomičniju sintezu. Smanjena potrošnja energije, manja upotreba rastvarača i niži troškovi tretmana otpada predstavljaju značajne prednosti sa ekonomskog aspekta. Dodatno, korišćenje lokalno dostupne biomase i nusproizvoda poljoprivrede ili prehrambene industrije može doprineti smanjenju troškova sirovina i povećanju održivosti samog procesa [39].

Pored ekoloških i ekonomskih prednosti, održivi pristupi sintezi nanomaterijala imaju važnu ulogu i u razvoju koncepta cirkularne ekonomije. Umesto linearnog modela „proizvodnja–upotreba–odlaganje“, ovakav pristup podrazumeva ponovno iskorišćenje materijala i otpada kroz procese valorizacije. Biomasa i biootpad tako postaju izvor vrednih funkcionalnih materijala, čime se istovremeno smanjuje količina otpada i potreba za korišćenjem novih resursa [40]. Posebno je značajno što se nakon sinteze metalnih nanočestica preostala biomasa može dodatno koristiti za dobijanje ugljeničnih materijala, čime se postiže potpunije iskorišćenje početnog bioresursa [41].

Poseban aspekt održivosti odnosi se i na izbor uslova termičke obrade biomase. Niže temperature karbonizacije mogu doprineti smanjenju ukupne potrošnje energije i manjim emisijama CO₂ [42], što je značajno sa stanovišta ekološke i ekonomske prihvatljivosti procesa. Zbog toga se sve više teži razvoju materijala dobijenih pri blažim reakcionim uslovima, koji mogu pokazati iste ili slične performanse kao materijali sintetisani na višim temperaturama ili dodatno tretirani fizičkom i hemijskom aktivacijom. Takav pristup je naročito važan ukoliko se uspe postiže zadovoljavajuća poroznost, stabilnost i adsorpciona efikasnost bez primene energetski zahtevnih ili hemijski intenzivnih postupaka [43].

Značaj razvoja održivih tehnologija prepoznat je i kroz SDGs, koji predstavljaju globalni okvir za usmeravanje naučnih, tehnoloških i industrijskih aktivnosti ka odgovornijem korišćenju resursa. U kontekstu ove disertacije posebno su značajni SDG 6, SDG 12 i SDG 13. SDG 6 odnosi se na obezbeđivanje dostupnosti i održivog upravljanja vodom i sanitacijom za sve, zbog čega je neposredno povezan sa razvojem materijala i tehnologija namenjenih tretmanu zagađenih voda. Razvoj nanomaterijala dobijenih iz obnovljivih izvora, koji se mogu primeniti za uklanjanje zagađivača iz vodenih sistema, doprinosi unapređenju kvaliteta vode i smanjenju negativnog uticaja otpadnih tokova na životnu sredinu. SDG 12, koji se odnosi na odgovornu proizvodnju i potrošnju, posebno je važan sa aspekta racionalnog korišćenja sirovina, smanjenja nastanka otpada i valorizacije biootpada. Sa druge strane, SDG 13 podrazumeva preduzimanje mera u borbi protiv klimatskih promena i njihovih posledica, što se može povezati sa smanjenjem potrošnje energije, emisija i zavisnosti od konvencionalnih, energetski zahtevnih metoda sinteze. U tom smislu, održivi pristupi sintezi nanomaterijala nisu značajni samo kao laboratorijska alternativa konvencionalnim metodama, već predstavljaju deo šire strategije koja

povezuje zaštitu voda, odgovorno upravljanje resursima i smanjenje ukupnog ekološkog opterećenja [13].

Iako zeleni pristupi sintezi nanomaterijala još uvek imaju određena ograničenja, poput varijabilnosti sastava prirodnih ekstrakata i otežane standardizacije procesa, njihov značaj kontinuirano raste. Razvoj ovih metoda omogućava povezivanje nanotehnologije sa principima održivosti, pri čemu se funkcionalnost materijala usklađuje sa potrebom za smanjenjem negativnog uticaja na životnu sredinu. Upravo zbog toga, održiva sinteza nanomaterijala danas predstavlja jedan od najznačajnijih pravaca razvoja savremene nauke o materijalima [44].

2.3. Srebrne nanočestice

AgNPs predstavljaju jednu od najistraživanijih vrsta nanočestica zbog specifičnih optičkih, elektronskih, katalitičkih i bioloških svojstava koja se značajno razlikuju od svojstava elementarnog srebra u makroskopskom obliku [45]. Njihova široka primena posledica je izražene hemijske reaktivnosti, velike specifične površine i mogućnosti interakcije sa različitim biomolekulima i mikroorganizmima [46]. Tokom poslednjih decenija, srebrne nanočestice privukle su veliku pažnju u oblastima bioloških i medicinskih istraživanja, farmacije [47], zaštite životne sredine [48], tekstilne industrije [45], senzorskih sistema [49] i razvoja antimikrobnih prevlaka [50].

Sinteza AgNPs može se ostvariti različitim fizičkim, hemijskim i biološkim metodama. Fizički pristupi, kao što su laserska ablacija, evaporacija ili kondenzacija, omogućavaju dobijanje relativno čistih nanočestica, ali najčešće zahtevaju složenu opremu, visoku potrošnju energije i specifične eksperimentalne uslove. Hemijske metode podrazumevaju redukciju srebrnih jona primenom različitih redukcionih agenasa, pri čemu se često koriste jedinjenja poput natrijum-borohidrida ili hidrazina. Iako ove metode omogućavaju dobru kontrolu veličine i morfologije nanočestica, njihov nedostatak predstavlja upotreba toksičnih hemikalija i generisanje potencijalno štetnih nusprodukata [51].

Zbog toga se poslednjih godina sve veća pažnja usmerava ka zelenim metodama sinteze AgNPs, koje predstavljaju održiviju i ekološki prihvatljiviju alternativu konvencionalnim pristupima. Kod ovih metoda, biljni ekstrakti, mikroorganizmi ili biomasa koriste se kao prirodni redukcion i stabilizacioni agensi [52]. Biljni metaboliti, uključujući polifenole, flavonoide, proteine i organske kiseline, mogu učestvovati u redukciji Ag^+ jona do elementarnog srebra, ali i stabilizaciji formiranih nanočestica sprečavajući njihovu agregaciju [53]. Na taj način se smanjuje potreba za dodatnim hemikalijama i energetski zahtevnim uslovima sinteze. Pored ekoloških prednosti, ovakav pristup omogućava jednostavniju pripremu, manju toksičnost sistema i mogućnost korišćenja obnovljivih sirovina i biootpada, zbog čega se zeleni pristup danas smatra jednim od najperspektivnijih načina AgNPs [53].

Jedna od najznačajnijih karakteristika AgNPs jeste pojava površinskog plazmanskog rezonantnog efekta (eng. *Surface plasmon resonance* – SPR). Ovaj fenomen nastaje usled kolektivnog oscilovanja elektrona na površini nanočestica pod dejstvom elektromagnetnog zračenja [54]. Za razliku od makroskopskog srebra, koje ne pokazuje izraženu apsorpciju u vidljivom delu spektra, AgNPs karakteriše intenzivan apsorpcioni maksimum u UV-Vis spektru, najčešće u oblasti oko 400 nm [55]. Upravo pojava ovog apsorpcionog maksimuma predstavlja jedan od osnovnih pokazatelja formiranja AgNPs u rastvoru. Položaj i intenzitet SPR maksimuma zavise od veličine, oblika, koncentracije i stepena agregacije nanočestica, kao i od prirode sredine u kojoj se nalaze [56].

Pored optičkih svojstava, AgNPs posebno su poznate po izraženom antimikrobnom i antibakterijskom dejstvu. Njihova sposobnost interakcije sa ćelijskim membranama mikroorganizama, stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i oslobađanja Ag^+ jona omogućava efikasno inhibiranje rasta velikog broja bakterija, gljivica i drugih mikroorganizama. Zbog toga se koriste u medicinskim materijalima, zaštitnim prevlakama [57], tekstilu [58], ambalaži [59], filterima za vodu [60] i različitim

dezinfekcionim sistemima [61]. Pored toga, AgNPs ispituju se i za primenu u biosenzorima [62], katalizi [63] i sistemima za tretman zagađenih voda [64].

Zahvaljujući kombinaciji specifičnih optičkih svojstava, izražene biološke aktivnosti i mogućnosti relativno jednostavne sinteze, AgNPs danas predstavljaju jednu od najznačajnijih grupa nanomaterijala sa širokim spektrom tehnoloških i biomedicinskih primena. U kontekstu održivog razvoja, poseban značaj imaju zeleni pristupi njihovoj sintezi, jer omogućavaju povezivanje funkcionalnosti nanomaterijala sa principima ekološki prihvatljive i održive proizvodnje.

2.3.1. Biljni materijali u zelenoj sintezi srebrnih nanočestica

Primena biljnih ekstrakata za dobijanje AgNPs privukla je značajnu pažnju naučne javnosti zbog jednostavnosti, održivosti i mogućnosti korišćenja obnovljivih sirovina. Prednost ovog pristupa ogleda se u dostupnosti biljnih materijala, lakoj pripremi ekstrakata i prisustvu različitih biološki aktivnih jedinjenja koja mogu učestvovati u formiranju nanočestica. Za razliku od konvencionalnih hemijskih metoda, u kojima se redukcija i stabilizacija najčešće postižu primenom sintetičkih reagensa, biljni ekstrakti omogućavaju odvijanje procesa u blažim i ekološki prihvatljivijim uslovima [44].

Tokom sinteze AgNPs korišćeni su različiti delovi biljaka, uključujući listove, plodove, koru, cvetove, semena i koren [53]. U literaturi su opisani brojni primeri primene ekstrakata biljaka kao što su nim (*Azadirachta indica*) [65], aloja vera (*Aloe vera*) [66], zeleni čaj (*Camellia sinensis*) [67], razne vrste citrusa (*Citrus*) [68-70], bosiljak (*Ocimum sanctum*) [71], eukaliptus (*Eucalyptus*) [72, 73], kao i različiti poljoprivredni i prehrambeni otpaci [74, 75]. Pored svežih biljnih materijala, sve više pažnje privlači korišćenje biootpada, poput ljuski voća, ostataka nakon ekstrakcije i drugih biljnih nusproizvoda, čime se sinteza nanočestica dodatno povezuje sa principima održivosti i cirkularne ekonomije.

Proces sinteze u velikoj meri zavisi od biomolekula prisutnih u biljnom ekstraktu. Fenolna jedinjenja, flavonoidi, terpenoidi, proteini, šećeri i organske kiseline mogu učestvovati u redukciji Ag⁺ jona do elementarnog srebra, ali i u stabilizaciji nastalih nanočestica adsorpcijom na njihovoj površini [6]. Zbog složenog hemijskog sastava biljnih ekstrakata, formiranje AgNPs najčešće nije rezultat delovanja samo jedne grupe jedinjenja, već kombinacije više paralelnih reakcija koje utiču na brzinu sinteze, stabilnost i morfologiju dobijenih čestica.

Vrsta korišćenog biljnog materijala značajno utiče na karakteristike sintetisanih AgNPs. Razlike u sastavu ekstrakata, koncentraciji aktivnih biomolekula i prisustvu različitih funkcionalnih grupa mogu dovesti do formiranja čestica različite veličine, oblika, stepena agregacije i površinskih svojstava [76]. Na primer, ekstrakti bogati polifenolima često pogoduju bržoj redukciji Ag⁺ i formiranju manjih nanočestica, dok prisustvo proteina i polisaharida može doprineti stabilizaciji sistema i sprečavanju izraženije agregacije. Pored prirode samog ekstrakta, važnu ulogu imaju i eksperimentalni uslovi, kao što su pH, temperatura, koncentracija srebrnih jona i odnos ekstrakta i prekursora [77].

Veličina i oblik sintetisanih AgNPs značajno utiču na njihova optička, katalitička i biološka svojstva. Manje čestice uglavnom imaju veću dostupnu površinu i izraženiju reaktivnost, dok oblik može uticati na položaj i intenzitet SPR maksimuma, kao i na interakcije sa mikroorganizmima ili zagađivačima. Zbog toga izbor biljnog materijala nije samo pitanje dostupnosti, već predstavlja jedan od ključnih faktora za kontrolu svojstava nanočestica i njihovo prilagođavanje konkretnoj primeni [78].

Pored ekoloških prednosti, primena biljnih ekstrakata omogućava relativno brzu sintezu bez potrebe za složenom opremom i agresivnim hemikalijama. Korišćenje lokalno dostupne biomase i biootpada dodatno smanjuje troškove procesa i povećava njegovu održivost. Zbog toga biljni sistemi predstavljaju važnu osnovu za razvoj zelenih metoda sinteze AgNPs, posebno u istraživanjima usmerenim ka dobijanju funkcionalnih materijala za biomedicinske i ekološke primene [74].

2.3.2. Biohemijski efekti srebrnih nanočestica

AgNPs ispoljavaju izraženu biološku aktivnost zahvaljujući malim dimenzijama, velikoj specifičnoj površini, reaktivnoj površini i sposobnosti delimičnog oksidativnog rastvaranja, pri čemu može doći do oslobađanja Ag^+ jona. Zbog toga mogu ostvarivati interakcije sa različitim komponentama bioloških sistema, uključujući ćelijske membrane, proteine, enzime, nukleinske kiseline i signalne molekule [79]. Priroda i intenzitet njihovog biološkog delovanja zavise od veličine i oblika nanočestica, raspodele veličina, specifične površine, površinskog naelektrisanja, koncentracije, površinske funkcionalizacije, stepena agregacije, stabilnosti u biološkom medijumu i vremena izlaganja [80].

Početna faza u biološkom delovanju AgNPs može biti njihova adsorpcija na površinu ćelijske membrane. Ova interakcija može promeniti integritet, fluidnost i propustljivost membrane, uticati na aktivnost membranskih proteina i poremetiti transport jona i metabolita [81]. U zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika čestica i tipa ćelije, AgNPs mogu biti internalizovane različitim endocitotskim mehanizmima. Nakon ulaska u ćeliju mogu se akumulirati u endozomima i lizozomima ili stupiti u interakcije sa drugim intracelularnim strukturama, čime se dodatno modifikuje ćelijski odgovor [82].

Biohemijski efekti AgNPs predstavljaju rezultat kombinovanog delovanja čestične forme srebra i Ag^+ jona oslobođenih sa njihove površine. Iako se srebro u jezgru AgNPs dominantno nalazi u elementarnom, nultom oksidacionom stanju, u biološkim medijumima može doći do delimičnog oksidativnog rastvaranja površine. Brzina ovog procesa zavisi od veličine čestica, sastava i stabilnosti površinskog omotača, pH vrednosti, jonske jačine i prisustva proteina, hloridnih, sulfidnih i drugih jona u medijumu [83, 84].

Ag^+ joni pokazuju izražen afinitet prema funkcionalnim grupama koje sadrže sumpor i azot, naročito prema sulfhidrilnim grupama proteina, što može izazvati promene u konformaciji proteina i inhibiciju enzimskih sistema uključenih u ćelijsko disanje, metabolizam i antioksidativnu zaštitu. Istovremeno, same nanočestice mogu adsorbovati proteine i formirati komplekse na površini, čime se mogu promeniti struktura, raspoloživost i funkcija biomolekula u neposrednom biointerfejsu [85, 86].

Važan mehanizam delovanja AgNPs jeste promena ćelijskog redoks statusa. Povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika može dovesti do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i genetičkog materijala, poremećaja funkcije mitohondrija i aktivacije signalnih puteva uključenih u regulaciju proliferacije, popravku oštećenja i ćelijsku smrt [87]. Manje nanočestice često pokazuju izraženiju biološku reaktivnost zbog veće specifične površine i potencijalno bržeg oslobađanja Ag^+ jona, ali intenzitet odgovora zavisi i od površinskog omotača, stabilnosti i korišćenog biološkog modela [82].

Biološki odgovor na AgNPs nije jednoznačan. U zavisnosti od koncentracije, trajanja izlaganja, tipa ćelija i fizičko-hemijskih karakteristika nanočestica mogu se javiti citotoksični, genotoksični, citostatski, prooksidativni ili apoptotski efekti. Pri nižim koncentracijama ili u prisustvu odgovarajućeg površinskog omotača moguć je i slabije izražen ili adaptivni odgovor ćelija koji nije praćen neposrednim gubitkom vijabilnosti. Zbog toga se biološki efekti AgNPs moraju tumačiti u zavisnosti od primenjene doze, ćelijskog modela i eksperimentalnih uslova [82, 88-90].

Ovakva dvosmernost odgovora posebno je značajna kod zeleno sintetisanih AgNPs. Biljni ekstrakti korišćeni tokom sinteze sadrže različite klase biomolekula koje mogu istovremeno učestvovati u redukciji Ag^+ jona, stabilizaciji formiranih nanočestica i modifikaciji njihove površine. Fenolna jedinjenja, flavonoidi, proteini, šećeri, organske kiseline, terpenoidi, naftokinoni i organosumporna jedinjenja mogu ostati adsorbovani na površini nanočestica i uticati na njihovu koloidnu stabilnost, površinsko naelektrisanje, kinetiku oslobađanja Ag^+ jona, internalizaciju i interakcije sa ćelijskim komponentama [74, 91, 92].

Prisustvo biogenog površinskog omotača ne znači automatski da su zeleno sintetisane AgNPs manje toksične od nanočestica dobijenih konvencionalnim metodama. Određene komponente omotača

mogu ublažiti biološku reaktivnost stabilizacijom površine i usporavanjem oslobađanja Ag^+ jona, dok druge mogu povećati afinitet čestica prema ćelijskoj membrani, olakšati internalizaciju ili doprineti prooksidativnom odgovoru. Zbog toga svaki tip zeleno sintetisanih AgNPs mora biti zasebno fizičko-hemijski okarakterisan i biološki ispitivan [77, 93].

S obzirom na njihovu bioaktivnost, AgNPs se razmatraju za razvoj antimikrobnih materijala, zaštitnih prevlaka, medicinskih sredstava, sistema za dezinfekciju i tretman vode, kao i nanoformulacija sa kontrolisanim biološkim delovanjem. Međutim, njihova potencijalna primena zahteva pouzdanu procenu bezbednosnog profila i razumevanje mehanizama dejstva u normalnim i tumorskim ćelijama [94-97].

Procena bioloških efekata AgNPs zbog toga zahteva primenu više komplementarnih metoda. Ispitivanje vijabilnosti i proliferacije omogućava procenu citotoksičnosti, analiza mikronukleusa i drugih citogenetičkih pokazatelja daje uvid u genotoksični potencijal, dok određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, promena u ćelijskom ciklusu i indukcije apoptoze doprinosi razumevanju mehanizama njihovog delovanja. Ovi aspekti detaljnije su razmotreni u narednim poglavljima.

2.3.2.1. Citotoksični i genotoksični efekti

S obzirom na sve širu primenu AgNPs u biomedicini, farmaceutskoj industriji, dijagnostici, zaštiti životne sredine i razvoju funkcionalnih materijala, procena njihovog biološkog dejstva i bezbednosnog profila predstavlja važan preduslov za njihovu dalju primenu. Iako se zelena sinteza smatra ekološki prihvatljivijom alternativom konvencionalnim hemijskim metodama sinteze nanočestica, biogeno poreklo samo po sebi ne podrazumeva odsustvo citotoksičnih ili genotoksičnih efekata. Biljni ekstrakti koji se koriste kao redukcion i stabilizacioni agensi mogu značajno uticati na veličinu, oblik, stabilnost, površinsko naelektrisanje i hemijski sastav površine dobijenih nanočestica, a time i na njihovu interakciju sa biološkim sistemima [98-102].

Za razliku od klasičnih hemijskih supstanci, nanočestice u biološkim medijumima predstavljaju heterogene i dinamične sisteme. Njihovo ponašanje ne zavisi isključivo od hemijskog sastava jezgra, već i od veličine i raspodele veličina čestica, morfologije, specifične površine, stepena agregacije i aglomeracije, površinskog naelektrisanja, rastvorljivosti, stabilnosti u medijumu i prisustva površinskih funkcionalnih grupa. Nakon kontakta sa biološkim tečnostima, na površini nanočestica može doći do adsorpcije proteina i drugih biomolekula, čime se formira biomolekulski omotač koji dodatno menja njihov biološki identitet. Zbog toga isti tip nanočestica može izazvati različite odgovore u zavisnosti od uslova sinteze, sastava eksperimentalnog medijuma, vremena izlaganja i korišćenog ćelijskog modela [103, 104].

Biološki efekti zeleno sintetisanih AgNPs nisu, prema tome, određeni samo prisustvom srebrnog jezgra. Biomolekuli poreklom iz biljnih ekstrakata mogu ostati adsorbovani na površini sintetisanih nanočestica i uticati na njihovu koloidnu stabilnost, kinetiku oslobađanja Ag^+ jona, afinitet prema ćelijskoj membrani, internalizaciju i interakcije sa intracelularnim strukturama. Priroda ovog površinskog omotača zavisi od fitohemijskog sastava polaznog ekstrakta, zbog čega izbor biljne vrste korišćene tokom sinteze može predstavljati jedan od ključnih faktora koji određuju krajnji biološki odgovor [105, 106].

U ovom radu ispitivan je biološki potencijal AgNPs sintetisanih metodom zelene sinteze korišćenjem etanolnih ekstrakata *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum*. Ove biljne vrste odabrane su zbog međusobno različitog sastava bioaktivnih jedinjenja koja mogu učestvovati u redukciji jona srebra, stabilizaciji formiranih nanočestica i modifikaciji njihove površine. Fenolna jedinjenja i flavonoidi prisutni u ekstraktu *Saintpaulia ionantha*, polifenoli, tanini i naftokinoni karakteristični za *Juglans regia*, kao i organosumporna jedinjenja iz ekstrakta *Allium sativum*, predstavljaju različite klase biomolekula sa izraženim redoks, antioksidativnim ili prooksidativnim svojstvima. Stoga se može

očekivati da nanočestice sintetisane korišćenjem ovih ekstrakata ispolje različite obrasce biološkog delovanja [107-109].

Polazeći od navedene pretpostavke, biološki efekti sintetisanih AgNPs procenjeni su na četiri humane ćelijske linije, odnosno na normalnim ćelijskim modelima TK6 i MRC-5 i tumorskim ćelijskim linijama HeLa i A549. Uporedna analiza normalnih i malignih ćelija omogućava procenu opšte biokompatibilnosti nanočestica, potencijalnih neželjenih efekata prema zdravom tkivu i eventualnog selektivnog delovanja prema tumorskim ćelijama.

TK6 ćelije su humane limfoblastoidne ćelije koje rastu u suspenziji i često se koriste u ispitivanjima citotoksičnosti i genotoksičnosti. Zbog relativno stabilnog kariotipa, očuvanih mehanizama odgovora na oštećenje DNK i pogodnosti za citogenetičke analize, predstavljaju značajan *in vitro* model za procenu potencijalnih sistemskih efekata različitih hemijskih agenasa i nanomaterijala. Njihova primena posebno je pogodna za izvođenje citokinezis-blok mikronukleus testa i procenu proliferativnog kapaciteta ćelijske populacije [110].

Za razliku od suspenzionih TK6 ćelija, adherentne ćelijske linije omogućavaju ispitivanje odgovora karakterističnih za ćelije solidnih tkiva nakon neposrednog kontakta sa nanočesticama. MRC-5 ćelije su humani diploidni fibroblasti poreklom iz plućnog tkiva i korišćene su kao reprezentativni model normalnih somatskih ćelija. Njihova primena omogućava procenu biokompatibilnosti i potencijalne toksičnosti AgNPs prema zdravim ćelijama, kao i poređenje sa odgovorom tumorskih ćelijskih linija [111].

HeLa ćelije predstavljaju model humanog adenokarcinoma grlića materice, dok A549 ćelije predstavljaju model adenokarcinoma pluća. Ove dobro okarakterisane tumorske ćelijske linije razlikuju se prema poreklu, metaboličkim osobinama, brzini proliferacije, bazalnom redoks statusu i mehanizmima odgovora na stres. Njihova uporedna primena omogućava procenu da li ispitivane AgNPs pokazuju opšti citotoksični efekat ili izraženije deluju na određeni tip malignih ćelija [112].

Kako bi se stekao potpuniji uvid u biološko delovanje zeleno sintetisanih AgNPs, analizirani su međusobno povezani pokazatelji koji obuhvataju vijabilnost i proliferativni kapacitet ćelija, produkciju reaktivnih vrsta kiseonika, indukciju apoptoze i nastanak hromozomskih oštećenja. Integracijom ovih parametara omogućena je procena ne samo intenziteta biološkog odgovora već i potencijalnih mehanizama delovanja nanočestica sintetisanih korišćenjem različitih biljnih ekstrakata.

Citotoksičnost predstavlja sposobnost ispitivanog materijala da naruši ćelijsku homeostazu, smanji vijabilnost ili proliferativni kapacitet ćelija i dovede do njihove smrti. Kod nanočestica citotoksični odgovor može nastati kao posledica više međusobno povezanih procesa, uključujući interakciju sa ćelijskom membranom, internalizaciju čestica, poremećaj mitohondrijalne funkcije, promenu redoks ravnoteže, inhibiciju enzimskih sistema, oštećenje genetičkog materijala, zastoj u ćelijskom ciklusu i aktivaciju programiranih ili neprogramiranih puteva ćelijske smrti [113].

Intenzitet citotoksičnog odgovora najčešće zavisi od koncentracije nanočestica i vremena izlaganja. Međutim, na odgovor značajno utiču i biološke osobine ćelijskog modela, uključujući brzinu proliferacije, metaboličku aktivnost, efikasnost antioksidativne zaštite, sposobnost popravke oštećenja DNK i aktivnost mehanizama kojima ćelija uklanja strane čestice i metalne jone. Zbog toga poređenje različitih ćelijskih linija ima veći informativni značaj od analize sprovedene na samo jednom ćelijskom modelu [114, 115].

Kod AgNPs se citotoksično dejstvo povezuje sa kombinovanim efektom samih čestica i jona srebra oslobođenih sa njihove površine. Iako se srebro u jezgru AgNPs dominantno nalazi u elementarnom, nultom oksidacionom stanju, u biološkim medijumima može doći do delimičnog oksidativnog rastvaranja površine i oslobađanja Ag^+ jona. Oslobođeni joni imaju izražen afinitet prema funkcionalnim grupama koje sadrže sumpor i azot, naročito prema sulfhidrilnim grupama proteina. Njihovo vezivanje može promeniti konformaciju i aktivnost enzima uključenih u energetski metabolizam, antioksidativnu zaštitu i održavanje ćelijske homeostaze [116].

Istovremeno, same nanočestice mogu adsorbovati proteine, stupati u interakciju sa lipidnim dvoslojem ćelijske membrane i biti internalizovane endocitozom ili drugim mehanizmima. Nakon ulaska u ćeliju mogu se akumulirati u endozomima i lizozomima, čija kisela sredina može pogodovati oslobađanju Ag^+ jona. Dalje interakcije sa mitohondrijama, proteinima, membranskim strukturama i genetičkim materijalom mogu doprineti razvoju citotoksičnog odgovora. Relativni doprinos čestičnog i jonskog oblika srebra zavisi od fizičko-hemijskih svojstava nanočestica, njihovog površinskog omotača i sastava biološkog medijuma [117].

Citotoksični efekti nanomaterijala najčešće se ispituju primenom *in vitro* testova kojima se procenjuju metabolička aktivnost, integritet membrane, broj živih ćelija ili ukupni sadržaj ćelijskih proteina. Testovi zasnovani na redukciji tetrazolijumskih soli ili resazurina koriste se kao pokazatelji metaboličke aktivnosti živih ćelija, dok sulforodamin B (SRB) test omogućava određivanje ukupnog proteinskog sadržaja adherentnih ćelijskih kultura. SRB se elektrostatički vezuje za bazne aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina, zbog čega je intenzitet dobijene boje proporcionalan ukupnoj ćelijskoj biomasi [118, 119].

Kod ispitivanja nanočestica rezultate testova vijabilnosti potrebno je tumačiti oprezno, budući da nanočestice mogu stupati u interakciju sa komponentama testa. Moguća je adsorpcija reagensa na površinu čestica, apsorpcija ili rasejanje svetlosti na talasnoj dužini merenja, kao i neposredna redukcija određenih indikatorskih molekula. Zbog toga je važno primeniti odgovarajuće kontrole i, kada je moguće, kombinovati testove zasnovane na različitim principima.

Međutim, izraženije smanjenje vijabilnosti tumorskih ćelija ne predstavlja samo po sebi dovoljan dokaz specifičnog antitumorskog delovanja. Tumorske i normalne ćelije mogu se razlikovati prema brzini rasta, metaboličkoj aktivnosti, bazalnom nivou ROS, unosu nanočestica i kapacitetu antioksidativnih i reparacionih sistema. Zbog toga selektivni efekat treba procenjivati zajedno sa rezultatima analize mehanizma ćelijske smrti, oksidativnog stresa i ćelijskog ciklusa, uz primenu međusobno uporedivih eksperimentalnih uslova [120].

Pored citotoksičnosti, važan aspekt biološke evaluacije predstavlja genotoksičnost, odnosno sposobnost supstance ili materijala da izazove primarna ili trajna oštećenja genetičkog materijala. Genotoksični efekti mogu obuhvatiti oksidativne modifikacije azotnih baza, jednolančane i dvolančane prekide DNK, hromozomske aberacije, poremećaje segregacije hromozoma, nastanak mikronukleusa i promene u ekspresiji gena uključenih u odgovor na oštećenje DNK [121, 122].

Genotoksično delovanje AgNPs može nastati direktnim i indirektnim mehanizmima. Direktni efekti podrazumevaju interakciju nanočestica ili oslobođenih Ag^+ jona sa komponentama genetičkog materijala i proteinima uključenim u organizaciju hromatina, replikaciju i popravku DNK. Ipak, smatra se da su indirektni mehanizmi često značajniji. Oni uključuju povećanu produkciju ROS, poremećaj funkcije mitohondrija, inhibiciju antioksidativnih i reparacionih enzima, inflamatorni odgovor i promene u regulaciji ćelijskog ciklusa [123].

Mikronukleusi (MN) predstavljaju jedan od najznačajnijih citogenetičkih pokazatelja hromozomskih oštećenja. Nastaju od acentričnih fragmenata hromozoma ili čitavih hromozoma koji tokom ćelijske deobe nisu pravilno uključeni u jedro ćerke ćelije. Povećana učestalost mikronukleusa može ukazivati na klastogeno dejstvo, koje dovodi do prekida hromozoma, ili na aneugeno dejstvo, koje izaziva poremećaje deobnog vretena i segregacije hromozoma [124].

Citokinezis-blok mikronukleus test (CBMN) široko se primenjuje za procenu genotoksičnosti u *in vitro* uslovima. U ovom testu citohalazin B sprečava citokinezu, odnosno fizičko razdvajanje ćerki ćelija, bez inhibicije deobe jedra. Na taj način nastaju binukleusne ćelije koje su tokom eksperimenta prošle kroz jednu nukleusnu deobu. Analizom MN u binukleusnim ćelijama smanjuje se mogućnost da se ćelije koje se nisu delile uključe u procenu genotoksičnog odgovora [124].

CBMN test omogućava i procenu proliferativnog statusa ćelija izračunavanjem citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI). CBPI se određuje na osnovu zastupljenosti mononukleusnih,

binukleusnih i multinukleusnih ćelija i predstavlja pokazatelj prosečnog broja ćelijskih ciklusa kroz koje je analizirana populacija prošla. Smanjenje CBPI vrednosti ukazuje na citostatski efekat, odnosno na usporavanje ili zaustavljanje proliferacije [125].

Povećana učestalost MN pri koncentracijama koje ne izazivaju prekomernu citotoksičnost predstavlja pouzdaniji pokazatelj genotoksičnog potencijala nego rezultat dobijen pri koncentracijama koje dovode do opsežne ćelijske smrti. Neophodno je, stoga, razlikovati primarno genotoksično dejstvo od sekundarnih oštećenja genetičkog materijala koja se mogu pojaviti kao posledica izrazite citotoksičnosti, oksidativnog stresa ili završnih faza apoptoze.

Kod AgNPs su u različitim ćelijskim modelima opisani smanjenje vijabilnosti, poremećaji proliferacije, promene u raspodeli ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, povećanje učestalosti MN i aktivacija programirane ćelijske smrti. Intenzitet ovih efekata zavisi od veličine i oblika čestica, površinskog naelektrisanja, stabilnosti, sastava površinskog omotača, brzine oslobađanja Ag^+ jona, koncentracije i vremena tretmana, kao i od osobina korišćenih ćelija [126, 127].

U tumorskim ćelijskim linijama, kao što su HeLa, A549, MCF-7 i HepG2, citotoksični i genotoksični efekti AgNPs često se razmatraju u kontekstu njihovog potencijalnog antitumorskog delovanja. Nasuprot tome, ispitivanja na normalnim fibroblastima, epitelnim ćelijama i limfoblastoidnim ćelijama neophodna su za procenu bezbednosnog profila. Samo uporednim ispitivanjem normalnih i tumorskih ćelijskih modela moguće je napraviti razliku između potencijalno poželjnog selektivnog delovanja i neselektivne opšte toksičnosti.

Zeleno sintetisane AgNPs imaju dodatnu specifičnost jer biljni ekstrakti istovremeno učestvuju u redukciji jona srebra i stabilizaciji dobijenih nanočestica. Fenolna jedinjenja, flavonoidi, organske kiseline, proteini, šećeri, terpenoidi i organosumporna jedinjenja mogu biti prisutni u površinskom omotaču nanočestica. Ove komponente mogu smanjiti agregaciju, promeniti površinsko naelektrisanje i biološku dostupnost srebra, ali mogu imati i sopstvenu biološku aktivnost [128, 129].

Prisustvo fitohemijskog omotača može ublažiti citotoksičnost stabilizacijom nanočestica i kontrolisanjem oslobađanja Ag^+ jona. Sa druge strane, određene površinske komponente mogu povećati afinitet nanočestica prema ćelijskoj membrani, olakšati njihovu internalizaciju ili doprineti prooksidativnom odgovoru. Zbog toga se ne može unapred pretpostaviti da će zeleno sintetisane AgNPs biti manje toksične od hemijski sintetisanih nanočestica. Svaki sintetisani sistem mora biti pojedinačno okarakterisan i ispitan u odgovarajućim biološkim modelima [130].

Za pouzdanu procenu citotoksičnog i genotoksičnog potencijala AgNPs neophodno je koristiti više komplementarnih metoda. Testovi vijabilnosti daju uvid u opšti citotoksični odgovor, CBMN test omogućava procenu hromozomskih oštećenja i proliferativnog statusa, dok analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze ukazuje na moguće posledice aktivacije kontrolnih tačaka i puteva ćelijske smrti. Određivanje produkcije ROS dodatno doprinosi razumevanju uloge oksidativnog stresa u nastanku posmatranih efekata.

Ovakav integrisani pristup posebno je značajan za ispitivanje AgNPs sintetisanih pomoću različitih biljnih ekstrakata, jer omogućava povezivanje njihovih fizičko-hemijskih svojstava i površinske hemije sa intenzitetom i prirodom biološkog odgovora. Uporedna analiza normalnih i tumorskih ćelijskih linija, uz praćenje vijabilnosti, proliferacije, genotoksičnosti, oksidativnog stresa i apoptoze, pruža osnovu za racionalniju procenu njihovog biomedicinskog potencijala i bezbednosnog profila.

2.3.2.2. Oksidativni stres i indukcija apoptoze

Oksidativni stres predstavlja jedan od najznačajnijih mehanizama biološkog delovanja metalnih nanočestica. Nastaje kada produkcija ROS (engl. *Reactive oxygen species*- ROS) prevaziđe

antioksidativni kapacitet ćelije, što može dovesti do poremećaja ćelijske signalizacije, oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina, disfunkcije mitohondrija, zastoja u ćelijskom ciklusu i aktivacije programirane ćelijske smrti. Reaktivne vrste kiseonika obuhvataju radikalske i neradikalske molekule, među kojima su najznačajniji superoksid-anjon-radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil-radikal ($\cdot OH$) i vodonik-peroksid (H_2O_2). U fiziološkim uslovima ROS učestvuju u regulaciji ćelijske signalizacije, proliferacije, diferencijacije i imunskog odgovora, dok njihovo prekomerno stvaranje dovodi do oksidativnog stresa [131, 132].

Redoks ravnoteža održava se delovanjem enzimskih i neenzimskih antioksidativnih sistema. Superoksid-dismutaza katalizuje prevođenje superoksid-anjon-radikala u H_2O_2 , koji zatim razgrađuju katalaza i glutation-peroksidaza, dok glutation predstavlja jedan od najvažnijih intracelularnih neenzimskih antioksidanasa. Biološki efekat ROS zavisi ne samo od njihove količine, već i od mesta nastanka, trajanja oksidativnog signala i sposobnosti ćelije da aktivira adaptivne mehanizme. Umeren porast ROS može stimulisati zaštitne signalne puteve, dok intenzivna ili dugotrajna produkcija dovodi do nepovratnog oštećenja ćelije [133].

Kod AgNPs povećana produkcija ROS može nastati usled interakcije nanočestica sa ćelijskom membranom, njihove internalizacije, poremećaja mitohondrijalne funkcije, inhibicije antioksidativnih enzima i oslobađanja Ag^+ jona oksidativnim rastvaranjem površine nanočestica. Ag^+ joni vezuju se za sulfhidrilne grupe proteina i glutationa, narušavaju redoks ravnotežu i mogu poremetiti prenos elektrona u respiratornom lancu, čime dodatno povećavaju produkciju ROS. Na taj način uspostavlja se pozitivna povratna sprega između mitohondrijalne disfunkcije i oksidativnog stresa [134, 135].

Mitohondrije predstavljaju centralno mesto povezivanja oksidativnog stresa, energetskog metabolizma i ćelijske smrti. Njihovo oštećenje može izazvati smanjenje membranskog potencijala, poremećaj sinteze ATP-a i oslobađanje proapoptotskih faktora. Istovremeno, oksidativni stres dovodi do peroksidacije membranskih lipida, oksidativne modifikacije proteina i oštećenja DNK, uključujući modifikacije baza, prekide lanaca i hromozomske aberacije. Ukoliko oštećenja nisu uspešno popravljena, aktiviraju se signalni putevi koji ćeliju usmeravaju ka apoptozi [136-138].

Apoptoza predstavlja regulisani oblik ćelijske smrti kojim se uklanjaju oštećene ili potencijalno opasne ćelije bez izraženog inflamatornog odgovora. Kod AgNPs ona se najčešće aktivira usled oksidativnog stresa, mitohondrijalne disfunkcije i oštećenja DNK. Povećana propustljivost spoljašnje mitohondrijalne membrane dovodi do oslobađanja citohroma c i aktivacije kaspazne kaskade, dok istovremeno aktivacija p53 i MAPK signalnih puteva može izazvati zastoj u ćelijskom ciklusu i povećanu ekspresiju proapoptotskih proteina. Nasuprot tome, pri blažim i reverzibilnim oštećenjima zastoj ćelijskog ciklusa omogućava popravku DNK i ponovno uspostavljanje homeostaze [139, 140].

Analiza ćelijskog ciklusa predstavlja važan pokazatelj biološkog delovanja nanočestica. Ćelijski ciklus obuhvata G_0/G_1 , S i G_2/M fazu, a promene u raspodeli ćelija između ovih faza mogu ukazivati na aktivaciju kontrolnih tačaka usled oštećenja DNK, replikativnog stresa ili poremećaja deobnog vretena. Povećanje udela ćelija u G_0/G_1 fazi ukazuje na sprečavanje ulaska u replikaciju DNK, dok akumulacija u S ili G_2/M fazi može biti posledica usporene replikacije ili oštećenja genetičkog materijala. Dobijeni rezultati uvek se tumače zajedno sa drugim pokazateljima citotoksičnosti i genotoksičnosti [141, 142].

Produkcija ROS najčešće se određuje primenom fluorescentne probe 2',7'-dihlorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA). Nakon ulaska u ćeliju i dejstva intracelularnih esteraza nastaje nefluorescentni DCFH, koji se oksidacijom prevodi u fluorescentni DCF. Intenzitet fluorescencije predstavlja relativni pokazatelj ukupnog intracelularnog oksidativnog statusa. Budući da DCFH-DA ne razlikuje pojedinačne vrste ROS i da nanočestice mogu uticati na fluorescentni signal, neophodna je primena odgovarajućih kontrola, uključujući pozitivnu kontrolu sa vodonik-peroksidom [143, 144].

Povezanost oksidativnog stresa, genotoksičnosti i apoptoze posebno je značajna u tumorskim ćelijama, koje često imaju povišen bazalni nivo ROS usled intenzivnog metabolizma i izmenjene

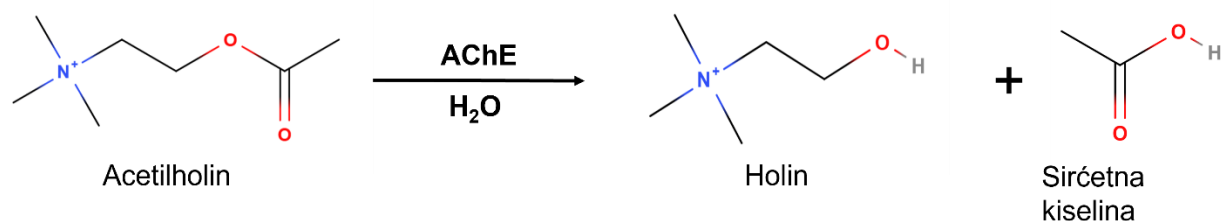
mitohondrijalne funkcije. Dodatno oksidativno opterećenje izazvano AgNPs može pomeriti ovu ravnotežu ka oštećenju i apoptozi, iako stepen selektivnosti zavisi od tipa ćelijske linije, koncentracije i karakteristika nanočestica.

Kod zeleno sintetisanih AgNPs biološki odgovor dodatno je modifikovan prisustvom biomolekula iz biljnih ekstrakata na površini nanočestica. Polifenoli, flavonoidi i druga jedinjenja mogu ispoljiti antioksidativna ili prooksidativna svojstva, uticati na oslobađanje Ag^+ jona, internalizaciju nanočestica i intenzitet oksidativnog odgovora. Zbog toga hemijski sastav površinskog omotača predstavlja važan faktor koji određuje biološku aktivnost zeleno sintetisanih AgNPs [145-147].

Uparedno ispitivanje AgNPs sintetisanih primenom ekstrakata *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum* omogućava procenu uticaja površinske hemije na citotoksičnost, genotoksičnost i oksidativni stres. Istovremena analiza normalnih i tumorskih ćelijskih linija pruža uvid u njihov bezbednosni profil i potencijalnu selektivnost, dok rezultati određivanja ROS, apoptoze i ćelijskog ciklusa predstavljaju komplementarne pokazatelje biološkog potencijala sintetisanih nanočestica.

2.3.2.3. Uticaj na aktivnost acetilholinesteraze

Acetilholinesteraza (eng. *Acetylcholinesterase* - AChE) predstavlja jedan od ključnih enzima nervnog sistema, odgovoran za hidrolizu neurotransmitera acetilholina u sinaptičkom prostoru. Na taj način omogućava pravilno prenošenje nervnih impulsa i regulaciju neuromišićne aktivnosti [148]. Mehanizam delovanja AChE zasniva se na katalitičkoj hidrolizi acetilholina na holin i sirćetnu kiselinu (acetat), čime se prekida prenos nervnog signala nakon njegove transmisije između neurona ili između nerva i mišića (Slika 2). Proces započinje vezivanjem acetilholina za aktivno mesto enzima, nakon čega dolazi do cepanja estarske veze i oslobađanja holina, dok se privremeno formira acetilovani enzim. U narednom koraku molekul vode hidrolizuje ovaj intermedijer, pri čemu se oslobađa acetat i regeneriše aktivno mesto enzima, omogućavajući novi katalitički ciklus. Zahvaljujući veoma velikoj brzini katalize, AChE efikasno uklanja acetilholin iz sinaptičkog prostora i sprečava kontinuiranu stimulaciju receptora. Inhibicija ovog enzima dovodi do akumulacije acetilholina u sinapsama, poremećaja neurotransmisije i razvoja neurotoksičnih efekata. Zbog toga se promene u aktivnosti AChE često koriste kao biohemijski marker neurotoksičnosti, oksidativnog stresa i izloženosti različitim zagađivačima, uključujući pesticide, teške metale i nanomaterijale [149, 150].



Slika 2. Ukupna reakcija hidrolize acetilholina

Zbog male veličine i izražene reaktivnosti, AgNPs mogu ostvarivati interakcije sa enzimskim sistemima, uključujući i AChE. Njihov uticaj na aktivnost AChE zavisi od više faktora, kao što su veličina i koncentracija nanočestica, površinska funkcionalizacija, stabilnost sistema, kao i tip biološkog modela. U literaturi su opisani i inhibitorski i potencijalno protektivni efekti AgNPs na aktivnost ovog enzima [151].

Negativan efekat AgNPs najčešće se povezuje sa inhibicijom aktivnosti AChE [152]. Pored direktne interakcije sa enzimom, važnu ulogu ima i oksidativni stres izazvan povećanom produkcijom ROS, koji može dovesti do promena u strukturi proteina i smanjenja enzimske aktivnosti [153]. Pokazano je da izlaganje organizama višim koncentracijama AgNPs može izazvati značajno smanjenje aktivnosti AChE, što se dovodi u vezu sa poremećajem neurotransmisije i mogućim neurotoksičnim efektima [154].

Sa druge strane, u određenim uslovima AgNPs mogu pokazati i indirektan protektivni efekat na aktivnost AChE. Ovakvi efekti uglavnom se povezuju sa njihovim antimikrobnim svojstvima i sposobnošću smanjenja prisustva drugih toksičnih agenasa u sistemu [79]. Takođe, površinski modifikovane ili biogenim putem sintetisane AgNPs mogu pokazivati manju toksičnost i stabilnije ponašanje u biološkim sredinama [155]. U pojedinim istraživanjima pokazano je da nanočestice sintetisane korišćenjem biljnih ekstrakata izazivaju znatno manju inhibiciju AChE u poređenju sa hemijski sintetisanim nanočesticama, što se dovodi u vezu sa prisustvom biomolekula na njihovoj površini i smanjenom produkcijom ROS [156].

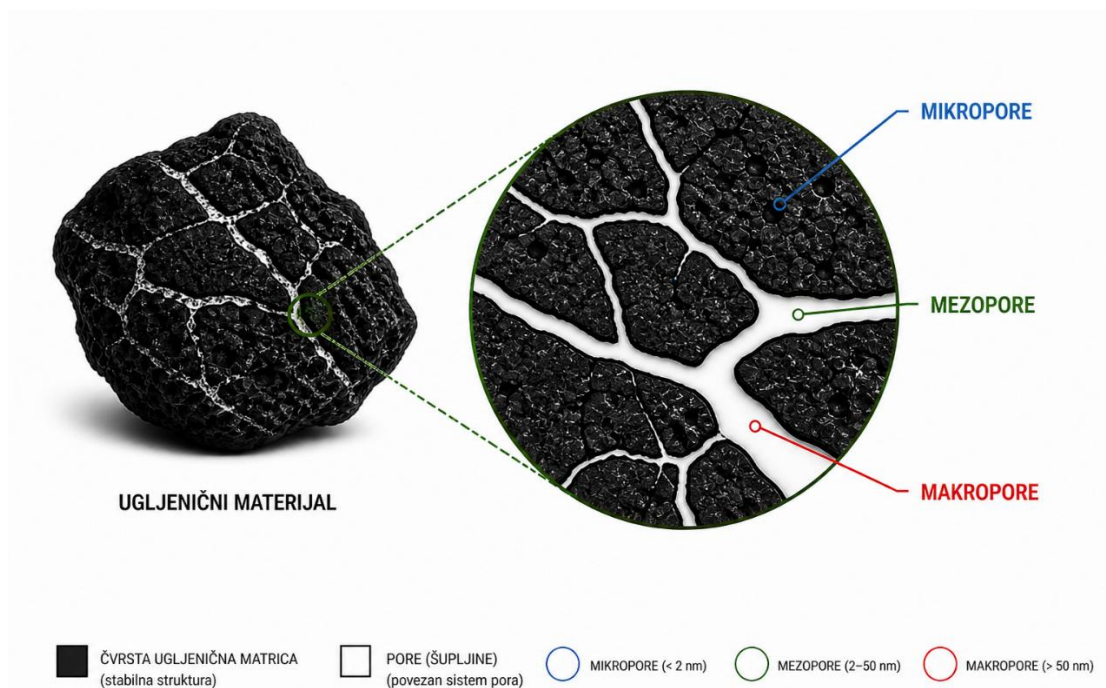
Uticaj AgNPs na aktivnost AChE od posebnog je značaja u toksikološkim i ekotoksikološkim istraživanjima, jer promene aktivnosti ovog enzima mogu ukazivati na potencijalne neurološke efekte izloženosti nanomaterijalima. Istovremeno, praćenje AChE aktivnosti može pružiti informacije o bezbednosti i biokompatibilnosti sintetisanih nanočestica, posebno kada se razvijaju sistemi namenjeni biomedicinskoj ili ekološkoj primeni.

2.4. Ugljenični materijali

Ugljenični materijali predstavljaju veoma raznovrsnu grupu materijala čija struktura i svojstva proizlaze iz sposobnosti ugljenika da gradi različite tipove hemijskih veza i formira različite strukturne organizacije. Zahvaljujući toj strukturnoj fleksibilnosti i mogućnosti modifikacije, ugljenični materijali danas imaju značajnu primenu u brojnim oblastima nauke i tehnologije [157]. Koriste se u procesima adsorpcije i separacije [158], heterogenoj katalizi [159], elektrohemijskim sistemima za skladištenje energije [160], kao i u razvoju funkcionalnih i kompozitnih materijala [161]. Posebno važnu ulogu imaju u zaštiti životne sredine, gde se primenjuju kao efikasni adsorbensi za uklanjanje različitih organskih i neorganskih zagađivača iz vodenih i gasovitih sistema [162].

Jedan od ključnih parametara koji određuje primenljivost ugljeničnih materijala jeste specifična površina, definisana kao ukupna dostupna površina po jedinici mase materijala. Ovaj parametar, koji se najčešće izražava u $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, direktno utiče na broj aktivnih mesta dostupnih za interakciju sa molekulima adsorbata ili reaktanata, a samim tim i na efikasnost adsorpcionih i katalitičkih procesa [163]. Materijali sa visoko razvijenom specifičnom površinom, poput nanostrukturnih ugljeničnih materijala, pokazuju izraženu sposobnost vezivanja molekula iz rastvora i gasne faze. Razvoj ovakve strukture najčešće se postiže kontrolisanom termohemijskom obradom i/ili postupcima aktivacije, pri čemu dolazi do formiranja razvijene porozne mreže i povećanja dostupnosti unutrašnjih površina [164].

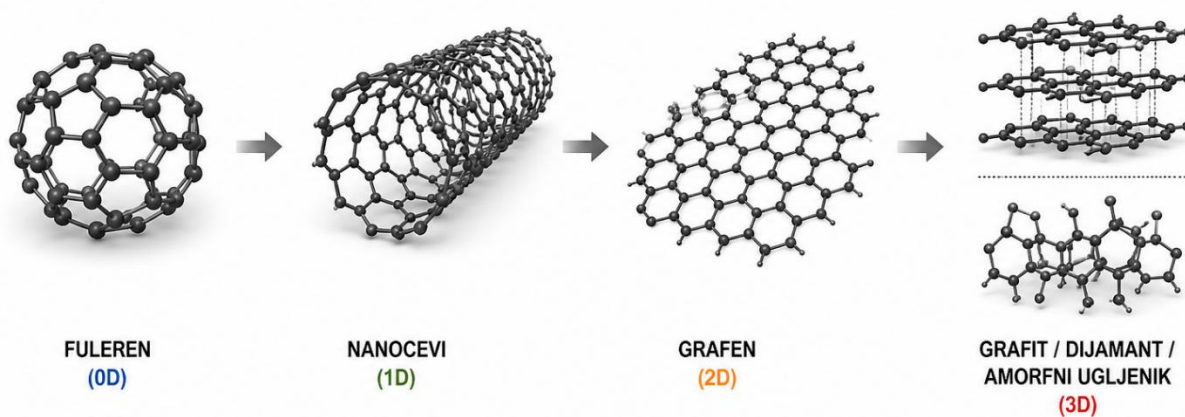
Pored veličine specifične površine, od ključnog značaja je i raspodela pora u materijalu. Prema IUPAC (eng. *International union of pure and applied chemistry* - IUPAC) klasifikaciji, pore se dele na mikropore (<2 nm), mezopore (2–50 nm) i makropore (>50 nm) (Slika 3) [165]. Svaka od ovih kategorija ima specifičnu ulogu u procesima transporta i vezivanja molekula. Mikropore doprinose visokom adsorpcionom kapacitetu, mezopore omogućavaju efikasniji transport adsorbata ka aktivnim mestima, dok makropore olakšavaju difuziju fluida kroz strukturu materijala. Zbog toga se optimalne performanse postižu kod materijala koji poseduju hijerarhijsku poroznost, odnosno kombinaciju različitih tipova pora [166].



Slika 3. Shematski prikaz klasifikacije pora ugljeničnih materijala prema njihovim dimenzijama

Hemijska svojstva površine predstavljaju dodatni faktor koji značajno utiče na interakcije između ugljeničnog materijala i adsorbenata [167]. Na ivicama grafitnih domena prisutna su reaktivna mesta na kojima može doći do vezivanja heteroatoma, što rezultuje formiranjem različitih funkcionalnih grupa. Najčešće su zastupljene kiseonične funkcionalne grupe (npr. karboksilne, hidroksilne i karbonilne). Ove grupe određuju kiselinsko-bazna svojstva površine, zbog čega se ugljenični materijali mogu smatrati amfoternim. Njihovo ukupno ponašanje u rastvoru zavisi od odnosa kiselih i baznih centara, kao i od pH vrednosti sredine, što direktno utiče na selektivnost i efikasnost adsorpcije različitih jedinjenja [168].

Strukturna raznovrsnost ugljeničnih materijala ogleda se i u postojanju različitih alotropskih formi (Slika 4). Fulereni predstavljaju zatvorene molekulske strukture sfernog ili elipsoidnog oblika, dok su ugljenične nanocevi cilindrične nanostrukture koje mogu biti jednoslojne ili višeslojne. Grafen je dvodimenzionalni materijal sastavljen od sp^2 hibridizovanih atoma ugljenika raspoređenih u heksagonalnoj rešetki, a njegovim naslaganjem nastaje grafit kao trodimenzionalna struktura. Nasuprot tome, dijamant je kristalna forma zasnovana na sp^3 hibridizaciji, sa izrazito čvrstom trodimenzionalnom mrežom. Ove razlike u strukturi uslovljavaju značajne razlike u mehaničkim, električnim i hemijskim svojstvima pojedinih alotropa [169, 170].



Slika 4. Alotropske modifikacije ugljenika

U poslednjim decenijama, sve veća pažnja usmerena je ka razvoju ugljeničnih materijala iz obnovljivih izvora. Biomasa i različiti oblici biootpada predstavljaju pogodne prekursore zbog svoje dostupnosti, niske cene i visokog sadržaja ugljenika [171]. Poljoprivredni ostaci, nusproizvodi prehrambene industrije i drugi organski otpad mogu se transformisati u funkcionalne ugljenične materijale primenom termičkih procesa, pre svega karbonizacije, često uz dodatne korake aktivacije. Ovakav pristup omogućava dobijanje materijala sa razvijenom poroznom strukturom i funkcionalizovanom površinom, uz istovremeno smanjenje količine otpada i doprinos principima održivog razvoja [172].

Na osnovu navedenog, može se zaključiti da su ugljenični materijali izuzetno prilagodljiva klasa materijala kod kojih se svojstva mogu ciljano dizajnirati u zavisnosti od primene. Kombinacija visoke specifične površine, kontrolisane poroznosti i modifikabilne površinske hemije čini ih posebno pogodnim za primene u oblasti zaštite životne sredine, uključujući uklanjanje organskih mikropolutanata i toksičnih jedinjenja iz vodenih sistema.

2.4.1. Ugljenični materijali dobijeni karbonizacijom biomase

Biomasa se definiše kao organski materijal biološkog porekla, uključujući biljne, životinjske i mikrobiološke izvore (Slika 5) [173, 174]. Ovi materijali bogati su ugljenikom, ali sadrže i vodonik, kiseonik, a u određenim slučajevima azot i druge heteroatome. Zbog takvog sastava, biomasa predstavlja pogodan prekursor za sintezu ugljeničnih materijala različitim termičkim procesima, pri čemu dolazi do razgradnje organskih komponenti i formiranja stabilne ugljenične matrice.



Slika 5. Šematski prikaz prirodnih izvora biomase za sintezu ugljeničnih materijala

Zahvaljujući mogućnosti kontrole strukture i svojstava, razvoj ugljeničnih materijala sve više se usmerava ka upotrebi obnovljivih prekursora, pre svega biomase. U poslednjim decenijama, ovakav pristup dobio je na značaju ne samo zbog tehničkih performansi dobijenih materijala, već i zbog potrebe za održivim upravljanjem resursima i smanjenjem opterećenja životne sredine [175]. U tom kontekstu, konverzija biootpada u funkcionalne ugljenične materijale predstavlja jedan od ključnih primera primene principa cirkularne ekonomije, gde se linearni model „proizvodnja-upotreba-odlaganje“ zamenjuje konceptom zatvorenih tokova materijala i energije [176].

Za razliku od konvencionalnih pristupa u kojima se biootpad posmatra kao nusproizvod bez dalje vrednosti, koncept cirkularne ekonomije podrazumeva njegovo ponovno uključivanje u proizvodne tokove kroz procese valorizacije [175]. Karbonizacija biomase omogućava upravo takvu transformaciju, pri čemu se organski otpad prevodi u stabilne i funkcionalne ugljenične materijale sa širokim spektrom primena. Na ovaj način istovremeno se smanjuje količina otpada, umanjuje potreba za konvencionalnim sirovinama i razvijaju materijali sa unapred definisanim svojstvima [177].

U literaturi je opisan veliki broj različitih tipova biomase korišćenih za ovu namenu, uključujući poljoprivredne ostatke (npr. ljuške plodova, stabljike i slamu) [178], šumske ostatke (piljevinu i koru drveta) [179], industrijske nusproizvode iz prehrambene [180] i tekstilne industrije [181], kao i različite oblike biološkog otpada [182]. Upravo ova raznovrsnost predstavlja jednu od glavnih prednosti održivog pristupa zasnovanog na valorizaciji otpada, jer omogućava da lokalno dostupni resursi budu direktno uključeni u proizvodnju funkcionalnih materijala.

Jedan od najvažnijih procesa u ovoj transformaciji jeste karbonizacija, najčešće u formi pirolize, koja podrazumeva termičku razgradnju biomase u inertnoj atmosferi. Tokom ovog procesa dolazi do izdvajanja gasovitih i lako isparljivih komponenti biomase i formiranja čvrste ugljenične strukture bogate ugljenikom [183]. Naknadnim postupcima, kao što su hemijska ili fizička aktivacija, moguće je dodatno razviti poroznost i modifikovati površinska svojstva, čime se postiže veća funkcionalnost materijala.

Svojstva dobijenih ugljeničnih materijala u velikoj meri zavise od prirode korišćenog prekursora, što dodatno naglašava značaj pravilnog izbora biomase. Lignocelulozni materijali često dovode do razvoja mikroporoznih struktura sa visokom specifičnom površinom, dok biomasa bogata azotom može rezultovati materijalima sa ugrađenim heteroatomima i specifičnim površinskim funkcionalnostima.

Morfološke karakteristike početnog materijala takođe mogu biti delimično očuvane tokom karbonizacije, što omogućava dodatnu kontrolu teksturalnih svojstava [184].

2.4.2. Uticaj uslova karbonizacije na strukturu i svojstva materijala

Termohemijska konverzija biomase predstavlja osnovni korak u dobijanju ugljeničnih materijala, pri čemu izbor procesa i uslova direktno određuje njihovu strukturu i funkcionalna svojstva. Različiti pristupi, uključujući pirolizu, karbonizaciju, gasifikaciju i hidrotermalnu karbonizaciju, omogućavaju transformaciju organske matrice u čvrste ugljenične materijale sa različitim stepenom uređenosti, poroznosti i hemijske funkcionalnosti. Iako svaki od ovih procesa ima specifične ciljeve, karbonizacija i piroliza se najčešće koriste za sintezu materijala namenjenih adsorpcionim primenama [185, 186].

Temperatura karbonizacije predstavlja jedan od najvažnijih parametara koji utiču na konačna svojstva materijala. Pri nižim temperaturama (npr. 300-400 °C) dolazi do delimične razgradnje biomase, pri čemu materijali zadržavaju značajan broj kiseoničnih funkcionalnih grupa i pokazuju relativno slabo razvijenu poroznost, sa specifičnom površinom često manjom od 50-100 m² g⁻¹ [187, 188]. Sa povećanjem temperature (500-700 °C) intenziviraju se procesi razgradnje organske matrice, što dovodi do formiranja primarne mikroporoznosti i značajnog porasta specifične površine, koja može dostići nekoliko stotina m² g⁻¹. Istovremeno dolazi do smanjenja broja površinskih funkcionalnih grupa [187, 189]. Na još višim temperaturama (iznad 800 °C), dolazi do dodatnog razvoja poroznosti i povećanja uređenosti strukture, pri čemu vrednosti specifične površine mogu premašiti 500 m² g⁻¹. Međutim, pri intenzivnijoj termičkoj obradi može doći do širenja i međusobnog povezivanja manjih pora, što dovodi do promene raspodele poroznosti i povećanja udela većih pora [188].

S obzirom na to da sama karbonizacija često ne obezbeđuje dovoljnu razvijenost porozne strukture, primenjuju se dodatni postupci aktivacije. Fizička aktivacija podrazumeva tretman karbonizovanog materijala oksidujućim gasovima, kao što su CO₂ ili vodena para, pri povišenim temperaturama [190]. Tokom ovog procesa dolazi do selektivne gasifikacije ugljenične matrice, pri čemu se uklanjaju manje stabilni delovi strukture i formira mreža pora. U zavisnosti od uslova, specifična površina može značajno porasti, uz izražen razvoj mikropora. Aktivacija vodenom parom često dovodi do većeg udela mikropora, dok CO₂ može pogodovati razvoju užih mikropora i početnih mezopora [190].

Za razliku od fizičke aktivacije, hemijska aktivacija podrazumeva tretman prekursora hemijskim agensima pre ili nakon karbonizacije [191]. Najčešće korišćeni agensi, poput KOH i H₃PO₄, omogućavaju istovremeni razvoj porozne strukture i modifikaciju hemijskih svojstava površine materijala [192-195]. U slučaju aktivacije kalijum hidroksidom, tokom zagrevanja dolazi do niza reakcija pri kojima nastaju gasoviti produkti i elementarni kalijum, koji može prodirati u unutrašnjost ugljenične strukture i izazvati njeno širenje. Kao posledica toga formira se izrazito razvijena mikroporozna struktura, a specifična površina se značajno povećava. Ovaj proces istovremeno povećava broj aktivnih mesta i utiče na raspodelu naelektrisanja na površini [196]. Aktivacija H₃PO₄ dovodi do drugačijeg razvoja strukture. U ovom slučaju, pored formiranja mikropora, dolazi i do izraženijeg razvoja mezopora, što rezultuje materijalima sa umerenim vrednostima specifične površine, ali boljom pristupačnošću pora za veće molekule [197]. Ovakva porozna struktura je posebno pogodna za adsorpciju organskih molekula većih dimenzija [198].

Kombinovani pristupi, koji uključuju fizičko-hemijsku aktivaciju, omogućavaju dodatnu kontrolu nad strukturom i svojstvima materijala. Integracijom ova dva pristupa moguće je dobiti materijale sa visokom specifičnom površinom i optimizovanom raspodelom mikro- i mezopora, čime se unapređuju i kapacitet i kinetika adsorpcije [199].

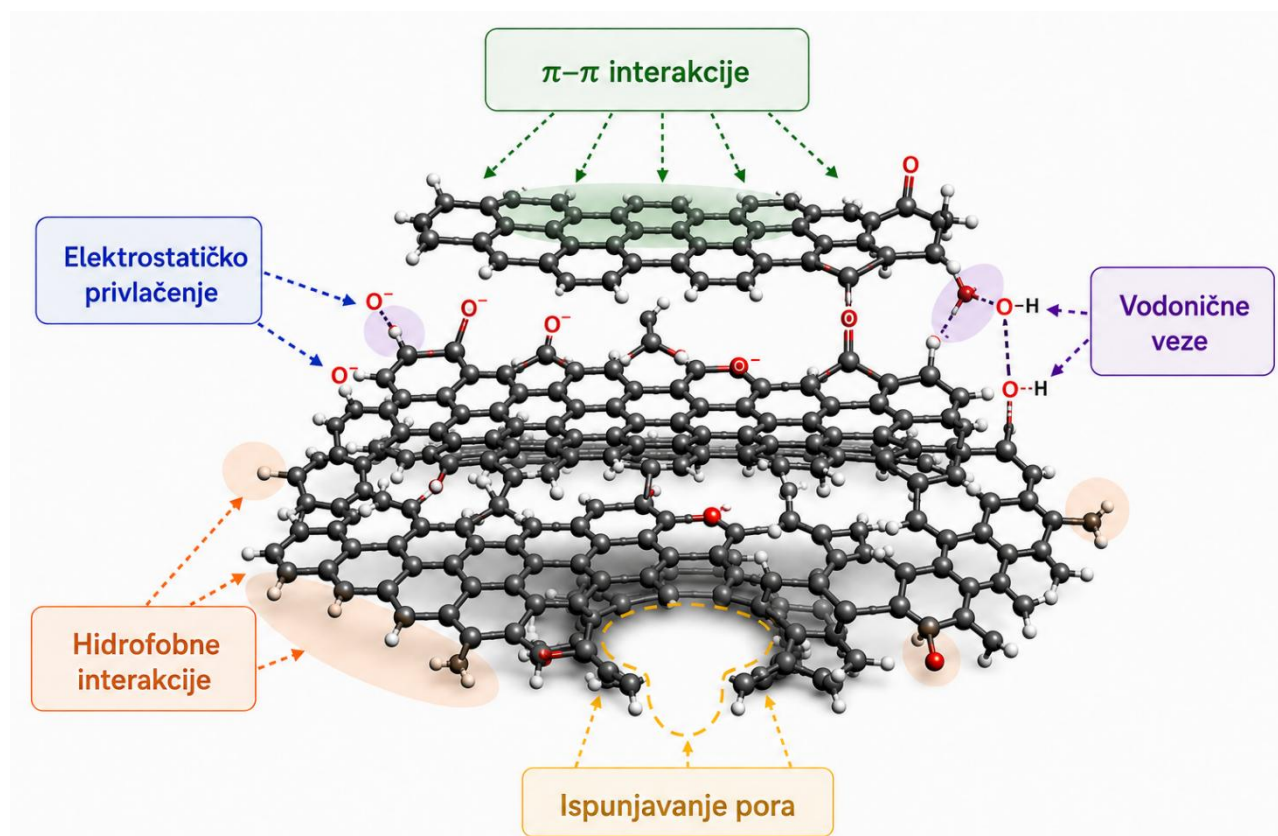
U tom kontekstu, optimizacija uslova karbonizacije i aktivacije predstavlja balans između razvoja specifične površine, očuvanja ili modifikacije površinskih funkcionalnih grupa i obezbeđivanja

odgovarajuće porozne strukture. Povećanje temperature i intenziteta aktivacije često vodi ka većim vrednostima specifične površine, ali i ka smanjenju broja funkcionalnih grupa, dok niže temperature daju hemijski aktivnije, ali teksturalno slabije razvijene materijale.

2.4.3. Primena ugljeničnih materijala dobijenih karbonizacijom biomase u zaštiti životne sredine

Kao što je već napomenuto, ugljenični materijali dobijeni karbonizacijom biomase predstavljaju značajnu klasu funkcionalnih materijala u oblasti zaštite životne sredine, zahvaljujući kombinaciji razvijene porozne strukture, visoke specifične površine i prilagodljive površinske hemije. Ove karakteristike omogućavaju efikasnu interakciju sa različitim vrstama zagađivača, zbog čega se ovi materijali intenzivno primenjuju u procesima prečišćavanja vodenih sistema. Njihova dodatna prednost ogleda se u održivom poreklu i mogućnosti dobijanja iz obnovljivih resursa, što ih čini pogodnim za primenu u ekološki prihvatljivim tehnologijama.

Najrasprostranjenija primena ugljeničnih materijala iz biomase jeste u adsorpcionim procesima. Kombinacija mikropora, koje obezbeđuju visok adsorpcioni kapacitet, i mezopora i makropora, koje omogućavaju transport molekula ka aktivnim mestima, doprinosi efikasnom uklanjanju različitih klasa zagađivača [200]. U tom smislu, ovi materijali pokazuju izraženu efikasnost u uklanjanju organskih mikropolutanata, katjonskih boja, farmaceutskih ostataka i jona teških metala [201-203]. Na primer, Milanković i saradnici ispitivali su uklanjanje organofosfatnih pesticida primenom ugljeničnih materijala dobijenih iz taloga kafe, pri čemu su pokazali da dobijeni adsorbensi poseduju značajan potencijal za primenu u tretmanu kontaminiranih voda [204]. Slično tome, Lazarević-Pašti i saradnici proučavali su adsorpciju hlorthirifosa na ugljeničnim materijalima dobijenim karbonizacijom biomase, pri čemu je pokazano da razvijena porozna struktura i prisustvo odgovarajućih površinskih funkcionalnih grupa omogućavaju efikasno uklanjanje pesticida iz vodenih rastvora [205]. U navedenim istraživanjima potvrđeno je da izbor prekursora i uslovi sinteze značajno utiču na adsorpcione performanse materijala, što dodatno naglašava značaj racionalnog dizajniranja adsorbenasa za konkretnu primenu. Šematski prikaz predloženih mehanizama adsorpcije, uključujući π - π interakcije, elektrostatičke interakcije, vodonične veze, hidrofobne interakcije i efekte ispunjavanja pora koji se odvijaju na površini ugljeničnog materijala, prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Šematski prikaz predloženih mehanizama adsorpcije na površinama ugljeničnih materijala dobijenih iz biomase, uključujući π - π interakcije, elektrostatičke interakcije, vodonične veze, hidrofobne interakcije i efekat ispunjavanja pora.

Pored pesticida, posebno važan pravac primene predstavlja uklanjanje sintetičkih boja iz vodenih sistema. Brojna istraživanja pokazala su da aktivni ugljevi, biočar i drugi ugljenični materijali dobijeni iz različitih poljoprivrednih ostataka mogu efikasno uklanjati katjonske boje, kao što su MB, RB, CV i MG [206-209]. Na primer, ugljenični materijali dobijeni iz biljnih prekursora, kao što su *Juglans regia* i *Allium sativum*, pokazali su izraženu efikasnost u uklanjanju metilenskog plavog i rodamina B, pri čemu su materijali karbonisani na višoj temperaturi postizali znatno veće adsorpcione kapacitete usled razvijenije porozne strukture i veće specifične površine [210-213]. Takođe, ugljenični materijali dobijeni iz taloga kafe pokazali su visok afinitet prema CV, što potvrđuje mogućnost primene ovog rasprostranjenog biootpada za tretman obojenih otpadnih voda [214]. Slično tome, različiti adsorbensi dobijeni iz biomase pokazali su značajan potencijal za uklanjanje malahitnog zelenog, pri čemu se efikasnost procesa povezuje sa kombinacijom poroznosti, aromatične strukture površine i prisustva funkcionalnih grupa [215]. U mnogim slučajevima visoka efikasnost uklanjanja pripisuje se kombinaciji π - π interakcija između aromatičnih struktura boja i ugljenične površine, elektrostatičkog privlačenja, vodoničnih veza i razvijene porozne strukture adsorbensa [216]. Ovi rezultati ukazuju da ugljenični materijali iz biomase imaju veliki potencijal za tretman obojenih otpadnih voda, posebno onih koje potiču iz tekstilne i srodnih industrija.

Značajna primena ovih materijala zabeležena je i u tretmanu kompleksnih vodenih matrica, gde su pored ciljnih zagađivača prisutne i prirodne organske materije, neorganski joni i druge interferentne supstance. U takvim uslovima performanse adsorbenasa zavise ne samo od njihovih strukturnih karakteristika, već i od sposobnosti selektivne interakcije sa ciljanim jedinjenjima. Ugljenični materijali iz biomase često pokazuju dobru stabilnost i efikasnost čak i u prisustvu konkurentnih supstanci, što ih

čini pogodnim za primenu u realnim sistemima. Dodatno, njihova upotreba u dinamičkim uslovima, kao što su protočni reaktori i filtracioni sistemi, omogućava efikasno uklanjanje zagađivača pri kratkim vremenima kontakta, što je važno za praktičnu primenu.

Pored klasične adsorpcije, ugljenični materijali dobijeni iz biomase mogu imati značajnu ulogu i u naprednim procesima tretmana obojenih otpadnih voda. Funkcionalizovane površine, naročito one koje sadrže kiseonične, azotne ili druge heteroatomske grupe, mogu učestvovati u aktivaciji oksidacionih agenasa, kao što su vodonik-peroksid ili persulfati. Na taj način omogućava se razgradnja stabilnih organskih jedinjenja, uključujući sintetičke boje koje se zbog razvijene aromatične strukture i visoke hemijske postojanosti često teško uklanjaju konvencionalnim metodama. U ovakvim sistemima ugljenični materijali ne doprinose samo uklanjanju boja iz vodene faze, već i njihovoj delimičnoj ili potpunoj transformaciji u manje obojene i potencijalno manje štetne proizvode, što je posebno značajno za tretman efluenta tekstilne i srodnih industrija.

Pored adsorpcije i katalitički potpomognute razgradnje, ovi materijali mogu se primenjivati i u detekciji zagađivača. Zahvaljujući električnoj provodljivosti, razvijenoj površini i mogućnosti funkcionalizacije, ugljenični materijali dobijeni iz biomase mogu služiti kao aktivne komponente elektrohemijskih senzora za praćenje organskih zagađivača u vodi. U kontekstu katjonskih boja, ovakav pristup je značajan jer omogućava detekciju niskih koncentracija boja i njihovih razgradnih proizvoda, kao i praćenje efikasnosti procesa tretmana. Budući da i male količine boja mogu promeniti providnost vode i uticati na fotosintetičku aktivnost akvatičnih organizama, razvoj senzorskih sistema za njihov monitoring predstavlja važan dodatni pravac primene ugljeničnih materijala.

Široka primena ugljeničnih materijala iz biomase dodatno je uslovljena njihovom ekološkom prihvatljivošću i mogućnošću regeneracije. Nakon zasićenja, ovi materijali se mogu regenerisati primenom fizičkih, hemijskih ili termičkih postupaka, čime se omogućava njihova višekratna upotreba i smanjenje operativnih troškova. Time se dodatno potvrđuje njihova uloga u razvoju održivih tehnologija za tretman zagađenih voda, posebno obojenih otpadnih voda koje zahtevaju efikasno uklanjanje i kontinuirano praćenje prisustva sintetičkih boja.

2.4.4. Katjonske boje kao zagađivači vodenih sistema

Boje predstavljaju široku grupu organskih jedinjenja koja imaju sposobnost apsorpcije svetlosti u vidljivom delu spektra (400-700 nm), pri čemu dolazi do pojave karakteristične obojenosti [217]. Njihova struktura zasniva se na prisustvu hromofornih grupa (npr. azo $-N=N-$, karbonil $=C=O$, ili aromatičnih sistema), koje omogućavaju apsorpciju svetlosti, kao i auksohromnih grupa ($-OH$, $-NH_2$), koje utiču na intenzitet i stabilnost boje [218]. Zbog izražene hemijske stabilnosti, visoke obojenosti i relativno niske cene proizvodnje, sintetičke boje su danas dominantne u industrijskoj primeni [219].

Tekstilna industrija predstavlja jedan od dominantnih izvora katjonskih boja u industrijskim otpadnim vodama, gde se koriste za bojenje vlakana poput pamuka, svile, vune i sintetičkih materijala. Tokom procesa bojenja značajan deo boje ne vezuje se za vlakno i završava u otpadnim vodama, koje se često ispuštaju bez adekvatnog prečišćavanja [220]. Pored tekstilne industrije, katjonske boje se koriste i u proizvodnji papira, štamparstvu, preradi kože, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, kao i u biološkim i medicinskim analizama [221].

Jednom dospevši u vodene sisteme, ove boje pokazuju izraženu hemijsku stabilnost i otpornost na biodegradaciju, što omogućava njihovo dugotrajno zadržavanje i akumulaciju [222]. Važno je naglasiti da negativan uticaj katjonskih boja nije isključivo vezan za njihovu hemijsku toksičnost. Njihova izražena obojenost, stabilnost i otpornost na razgradnju čine ih kompleksnim zagađivačima koji istovremeno deluju na fizičkom, hemijskom i biološkom nivou. Upravo ova kombinacija efekata

predstavlja osnovni razlog zbog kojeg uklanjanje katjonskih boja iz vodenih sistema predstavlja jedan od ključnih izazova u savremenoj zaštiti životne sredine.

Već pri veoma niskim koncentracijama (često ispod 1 mg L^{-1}) mogu izazvati intenzivno obojenje vode, čime se značajno smanjuje prodiranje sunčeve svetlosti u dublje slojeve. Ovakva promena direktno utiče na fotosintetičku aktivnost vodenih biljaka i algi, što dovodi do smanjenja produkcije kiseonika, poremećaja trofičkih lanaca i ugrožavanja opstanka akvatičnih organizama [223].

Pored fizičkog efekta zasenjivanja, katjonske boje mogu imati i direktno štetno biološko dejstvo. Njihova struktura, bogata aromatičnim prstenovima i konjugovanim sistemima, omogućava interakciju sa ćelijskim membranama i biomolekulima. Kao posledica toga, mogu izazvati iritacije, mutacije i kancerogene efekte kod živih organizama [224].

U zavisnosti od hemijske strukture i ponašanja u rastvoru, boje se mogu klasifikovati na više načina. Jedna od najčešćih podela zasniva se na naelektrisanju molekula u vodenom rastvoru, pri čemu se razlikuju katjonske, anjonske i neutralne boje [219]. Katjonske boje disosuju u vodi dajući pozitivno naelektrisane jone, što ih čini posebno pogodnim za interakciju sa negativno naelektrisanim površinama, kao što su ćelijske membrane ili određeni adsorbensi. Pored toga, boje se često klasifikuju i prema hemijskoj strukturi, pri čemu se izdvajaju azo, antrahinonske, trifenilmetanske i heterociklične boje [225].

Katjonske boje koje su predmet ovog rada, najčešće pripadaju trifenilmetanskoj i heterocikličnoj grupi, koje karakterišu razvijeni aromatični sistemi i visoka hemijska stabilnost [226-228]. Zbog svoje široke primene, ove boje danas predstavljaju značajnu grupu organskih zagađivača koji se sve češće detektuju u vodenim sistemima, pre svega kao posledica intenzivne industrijske proizvodnje i nedovoljno efikasnog tretmana otpadnih voda [226-228].

Među najčešće proučavanim katjonskim bojama izdvajaju se MB, RB, CV i MG, koje se često koriste kao model zagađivači u istraživanjima. Njihove strukture su prikazane na Slici 7.

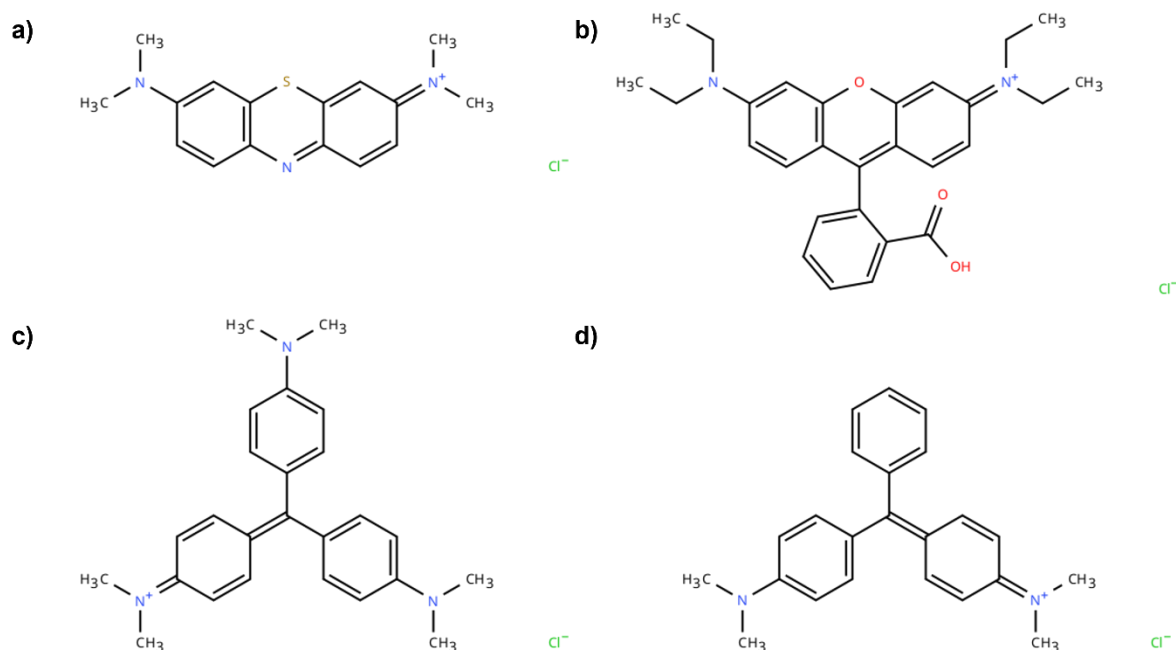
MB je heterociklična boja iz grupe tiazinskih jedinjenja, sa planarnom aromatičnom strukturom koja omogućava izražene π - π interakcije. Zbog dobre rastvorljivosti i stabilnosti, široko se primenjuje u tekstilnoj industriji, ali i u medicini i biohemiji kao indikator i dijagnostičko sredstvo. Nakon dospevanja u vodene sisteme može se dugo zadržavati zbog otpornosti na prirodne procese razgradnje. Njegovo prisustvo doprinosi obojenju vode i smanjenju prodiranja svetlosti, dok pri višim koncentracijama može izazvati poremećaje cirkulacije, oštećenje tkiva i negativne efekte na organizme koji žive u vodi [226, 229].

RB pripada ksantenskoj grupi boja i karakteriše ga razvijen konjugovani aromatični sistem sa amino i karboksilnim funkcionalnim grupama. Ova struktura doprinosi njegovoj izraženoj fluorescentnosti, zbog čega se koristi ne samo u tekstilnoj industriji, već i u optičkim i analitičkim primenama [230]. Zbog dobre rastvorljivosti i stabilnosti lako dospeva u vodene sisteme, gde može opstajati tokom dužeg vremenskog perioda. Njegovo prisustvo povezuje se sa potencijalnom toksičnošću, bioakumulacijom i mogućim negativnim efektima na rast, razvoj i reprodukciju akvatičnih organizama.

CV je tipičan predstavnik trifenilmetanskih boja, sa tri aromatična prstena povezana centralnim ugljenikovim atomom. Ovakva struktura obezbeđuje visoku hemijsku stabilnost i intenzivnu obojenost, ali istovremeno doprinosi njegovoj otpornosti na biodegradaciju [231]. Zbog dugotrajnog zadržavanja u životnoj sredini, CV može predstavljati rizik za vodene ekosisteme, dok su brojna istraživanja ukazala na njegov potencijalno mutageni i kancerogeni karakter. Pored direktne toksičnosti, njegovo prisustvo doprinosi smanjenju transparentnosti vode i narušavanju procesa fotosinteze u akvatičnim sistemima [231, 232].

MG, takođe iz grupe trifenilmetanskih boja, poseduje sličnu aromatičnu strukturu sa dodatnim funkcionalnim grupama koje utiču na njegovu reaktivnost i biološko delovanje. Koristi se u tekstilnoj industriji, ali i u akvakulturi kao antifungalni agens. Međutim, zbog izražene toksičnosti, mutagenosti i

potencijalne kancerogenosti njegova primena je danas značajno ograničena [233]. Poznato je da se MG i njegovi metaboliti mogu akumulirati u organizmima i duže vreme opstajati u životnoj sredini, zbog čega predstavljaju poseban problem za vodene ekosisteme i lance ishrane [234].



Slika 7. Strukture katjonskih boja: a) MB, b) RB, c) CV i d) MG

2.4.4.1. Metode uklanjanja katjonskih boja iz vodenih sistema

Kao što je već rečeno, uklanjanje katjonskih boja iz vodenih sistema predstavlja kompleksan zadatak usled njihove hemijske stabilnosti, visoke rastvorljivosti i otpornosti na biodegradaciju. Tokom poslednjih decenija razvijen je veliki broj metoda za tretman ovih zagađivača, koje se mogu podeliti na fizičke, hemijske i biološke pristupe [235]. Svaka od ovih metoda ima određene prednosti, ali i značajna ograničenja, zbog čega izbor odgovarajuće tehnologije zavisi od prirode zagađivača, koncentracije i uslova sistema.

Biološki tretmani, koji se zasnivaju na aktivnosti mikroorganizama, predstavljaju ekološki prihvatljiv pristup, ali su često ograničeni sporom kinetikom i niskom efikasnošću kada su u pitanju sintetičke boje, koje su po pravilu teško biorazgradive. Pored toga, prisustvo toksičnih komponenti može inhibirati rast mikroorganizama, čime se dodatno smanjuje efikasnost procesa [236].

Hemijske metode, posebno oksidacioni procesi, omogućavaju razgradnju molekula boja do manjih, često manje štetnih jedinjenja. Iako su ovi procesi efikasni u smislu dekolorizacije i razgradnje, njihov glavni nedostatak ogleda se u visokoj potrošnji reagensa i energije, kao i mogućnosti formiranja toksičnih međuprodukata. Dodatno, upotreba UV zračenja u nekim sistemima može predstavljati operativni i bezbednosni problem [237].

Membranske tehnologije (ultrafiltracija, nanofiltracija, reverzna osmoza) odlikuju se visokom efikasnošću separacije i mogućnošću uklanjanja i vrlo niskih koncentracija boja. Međutim, njihova primena je ograničena zapušenjem membrana, što dovodi do smanjenja protoka i povećanja operativnih troškova [238].

Koagulacija/flokulacija predstavlja jednostavnu i ekonomičnu metodu koja se često koristi kao predtretman. Ovaj proces se zasniva na destabilizaciji naelektrisanja molekula boje i njihovom

agregiranju u veće čestice koje se mogu ukloniti sedimentacijom. Iako je metoda brza i relativno efikasna, njeno ograničenje predstavlja potreba za većim dozama koagulanata i generisanje značajnih količina mulja. Takođe, efikasnost može biti smanjena u sistemima koji sadrže mešavine različitih tipova boja zbog kompetitivnih interakcija [239].

U odnosu na navedene metode, adsorpcija se izdvaja kao jedna od najefikasnijih i najčešće primenjivanih tehnologija za uklanjanje katjonskih boja iz vode. Njena prednost ogleda se u jednostavnosti primene, visokoj efikasnosti, relativno niskim troškovima i mogućnosti uklanjanja širokog spektra zagađivača. Za razliku od oksidacionih procesa, adsorpcija ne dovodi do razgradnje molekula, već do njihovog uklanjanja iz vodene faze, čime se izbegava formiranje potencijalno toksičnih nusprodukata [240].

Efikasnost adsorpcije u velikoj meri zavisi od svojstava adsorbensa, pre svega specifične površine, poroznosti i hemije površine. Materijali sa razvijenom mikroporoznom i mezoporoznom strukturom omogućavaju visok adsorpcioni kapacitet i povoljnu kinetiku. U tom kontekstu, različiti adsorbensi, uključujući aktivirane ugljenične materijale, ugljenične materijale dobijene karbonizacijom biomase i nanomaterijale, pokazali su izuzetne performanse. Brojna istraživanja potvrđuju njihovu efikasnost u uklanjanju različitih katjonskih boja. Tako su za MB uspešno primenjivani aktivirani ugljenični materijali dobijeni iz poljoprivrednog otpada, kao i ugljenični materijali sintetisani iz taloga kafe i drugih lignoceluloznih prekursora, pri čemu su ostvareni visoki adsorpcioni kapaciteti [241, 242]. Slično tome, RB efikasno je uklanjano korišćenjem biočara i aktiviranih ugljeničnih materijala dobijenih iz biljnih ostataka, kao i različitih kompozitnih adsorbenasa na bazi ugljenika [243, 244].

Visoka efikasnost adsorpcije zabeležena je i za CV, gde su aktivni ugljevi dobijeni karbonizacijom biomase, kao i magnetni ugljenični kompoziti, pokazali izražen afinitet prema ovoj boji [245, 246]. Sa druge strane, MG, koje se smatra jednom od najproblematičnijih katjonskih boja zbog svoje toksičnosti i postojanosti, uspešno je uklanjano primenom adsorbenasa dobijenih iz ljuski voća, poljoprivrednog otpada i različitih ugljeničnih nanomaterijala [247, 248]. Pored adsorpcionih procesa, za sve navedene boje razvijeni su i fotokatalitički i napredni oksidacioni sistemi koji omogućavaju njihovu razgradnju, ali su u poređenju sa adsorpcijom često energetski zahtevniji i složeniji za primenu [249].

Ipak, adsorpcija nije bez ograničenja. Nakon zasićenja adsorbensa, neophodna je njegova regeneracija ili adekvatno zbrinjavanje, što može uticati na ukupnu održivost procesa. Uprkos tome, zbog svoje fleksibilnosti i mogućnosti optimizacije kroz dizajn materijala, adsorpcija ostaje dominantan pristup u savremenim istraživanjima uklanjanja katjonskih boja [240].

U celini posmatrano, izbor metode uklanjanja katjonskih boja predstavlja kompromis između efikasnosti, troškova i ekološkog uticaja. Dok oksidacioni i membranski procesi nude visoku efikasnost, njihova primena je često ograničena ekonomskim i operativnim faktorima. Sa druge strane, adsorpcija, posebno uz upotrebu naprednih ugljeničnih materijala, pruža optimalan balans između performansi i održivosti, zbog čega se smatra jednim od najperspektivnijih pristupa u tretmanu obojenih otpadnih voda.

2.5. Adsorpcija na čvrstu površinu

Adsorpcija predstavlja proces akumulacije određene komponente na granici faza, najčešće na površini čvrstog materijala, pri čemu dolazi do promene koncentracije te komponente u odnosu na zapreminu sistema i smanjenja slobodne površinske energije. Čvrsta faza na kojoj se odvija proces naziva se adsorbens, dok se supstanca koja se vezuje za površinu označava kao adsorbat [250].

U zavisnosti od prirode interakcija između adsorbata i adsorbensa, razlikuju se dva osnovna tipa adsorpcije, fizička i hemijska adsorpcija, odnosno fizisorpcija i hemisorpcija. Fizisorpcija se zasniva na slabim intermolekulskim interakcijama, kao što su Van der Valsove sile i elektrostatičke interakcije. Ove sile su relativno male jačine, što se odražava i na niske vrednosti entalpije adsorpcije. Kao posledica toga, fizisorpcija je uglavnom reverzibilan proces, pri čemu se adsorbovane molekule mogu relativno lako ukloniti promenom temperature ili pritiska, bez značajnih promena u hemijskoj strukturi sistema [250, 251].

Za razliku od toga, hemisorpcija podrazumeva formiranje jačih interakcija između adsorbata i adsorbensa, koje često uključuju nastanak hemijskih veza. Ovakve interakcije karakterišu znatno veće vrednosti entalpije (često reda veličine stotina kJ mol⁻¹), kao i izraženija specifičnost prema određenim vrstama adsorbata. Hemisorpcija je u većini slučajeva ireverzibilna ili teško reverzibilna, a proces može biti praćen promenama u hemijskoj strukturi adsorbovanih vrsta ili same površine materijala [250, 251].

Na tok i efikasnost adsorpcije istovremeno utiču svojstva adsorbensa, osobine adsorbata i uslovi sredine u kojoj se proces odvija. Kod čvrstih adsorbenasa, posebno su značajni specifična površina, poroznost i hemijska priroda površine. Razvijena površina obezbeđuje veći broj dostupnih aktivnih mesta, dok raspodela pora određuje koliko lako molekuli adsorbata mogu da difunduju ka unutrašnjim delovima materijala. Zbog toga materijali sa povoljno razvijenom mikro- i mezoporoznom strukturom često pokazuju veći adsorpcioni kapacitet i bolju dostupnost aktivnih centara. Uslovi sredine dodatno određuju ravnotežu i brzinu adsorpcionog procesa. Temperatura može promeniti intenzitet interakcija između adsorbata i adsorbensa, zbog čega adsorpcija može imati egzoterman ili endoterman karakter. U gasovitim sistemima količina adsorbovanog materijala najčešće raste sa povećanjem pritiska, dok je u tečnim sistemima značajan uticaj početne koncentracije adsorbata. Posebno važnu ulogu ima pH vrednost, jer istovremeno utiče na naelektrisanje površine adsorbensa i jonizaciono stanje adsorbata. Na taj način menja se intenzitet elektrostatičkih, hidrofobnih i drugih međumolekulskih interakcija, što direktno određuje selektivnost i ukupnu efikasnost adsorpcije [252].

2.5.1. Kinetika adsorpcije

Kinetika adsorpcionog procesa opisuje promenu količine adsorbovanog kontaminanta u funkciji vremena i predstavlja značajan pristup za razumevanje brzine i mehanizma adsorpcije. Za kvantitativni opis ovog procesa razvijen je veći broj kinetičkih modela, među kojima se najčešće primenjuju modeli pseudo-prvog reda (eng. *Pseudo-first order* - PFO), pseudo-drugog reda (eng. *Pseudo-second order* - PSO), Elovichev model (eng. *Elovich*) i model intračestične difuzije (IDP) [253-255].

PFO, koji je prvi predložio Lagergren krajem XIX veka, zasniva se na pretpostavci da je brzina adsorpcije proporcionalna razlici između ravnotežne količine adsorbata i količine adsorbovane u datom trenutku [256]. Diferencijalni oblik ovog modela može se izraziti kao:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

gde je q_t (mg g^{-1}) količina adsorbata vezana za adsorbens u vremenu t (min), q_e (mg g^{-1}) ravnotežna adsorbovana količina, dok k_1 (min^{-1}) predstavlja konstantu brzine procesa. Integracijom jednačine (1), uz početni uslov $q_t=0$ za $t=0$, dobija se izraz [253]:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (2)$$

Za razliku od ovog pristupa, PSO, koji su razvili Ho i MekKaj, polazi od pretpostavke da je brzina adsorpcije određena kvadratom broja dostupnih aktivnih mesta na površini adsorbensa [257]. Diferencijalni oblik ovog modela dat je izrazom:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (3)$$

gde k_2 ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$) označava konstantu brzine adsorpcije drugog reda [253]. Integracijom jednačine (3), pod istim početnim uslovima, dobija se sledeći izraz:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (4)$$

Grafičkim prikazom zavisnosti q_t od vremena moguće je odrediti kinetičke parametre, uključujući konstante brzine i ravnotežni adsorpcioni kapacitet, za oba modela.

Iako PFO i PSO daju dobar opis eksperimentalnih podataka, oni ne pružaju direktan uvid u difuzione procese koji mogu ograničavati brzinu adsorpcije. U tom smislu, model intračestične difuzije, koji su predložili Veber i Moris, koristi se za analizu transporta adsorbata unutar porozne strukture adsorbensa. Ovaj model se izražava kao:

$$q_t = k_{id} t^{0.5} + C \quad (5)$$

gde k_{id} ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0.5}$) predstavlja konstantu brzine intračestične difuzije, dok konstanta C daje informaciju o debljini graničnog sloja. Veće vrednosti parametra C ukazuju na izraženiji uticaj spoljašnje difuzije, odnosno otpora prenosa mase kroz granični sloj [254, 258].

Adsorpcioni proces se najčešće odvija kroz više uzastopnih koraka. U početnoj fazi dolazi do transporta molekula adsorbata iz rastvora do spoljašnje površine adsorbensa (film ili spoljašnja difuzija), što se obično manifestuje naglim porastom adsorbovane količine. Nakon toga sledi difuzija adsorbata kroz pore adsorbensa, odnosno intračestična difuzija, pri čemu molekuli prodiru ka unutrašnjim aktivnim mestima. U završnoj fazi adsorbovane vrste dospevaju do najmanjih pora i najteže dostupnih aktivnih centara, pri čemu se brzina adsorpcije postepeno smanjuje sve do dostizanja ravnoteže. Zbog toga grafički prikaz zavisnosti q_t od $t^{0.5}$ često pokazuje više linearnih segmenata, od kojih svaki odgovara različitoj fazi procesa. Ukoliko prava prolazi kroz koordinatni početak ($C=0$), intračestična difuzija predstavlja jedini korak koji kontroliše brzinu adsorpcije. Međutim, u većini realnih sistema prisustvo preseka sa ordinatom ukazuje da, pored intračestične difuzije, značajan doprinos imaju i drugi mehanizmi prenosa mase, pre svega spoljašnja difuzija kroz granični sloj [253, 254].

Elovičev model predstavlja još jedan često korišćen pristup za opisivanje kinetike adsorpcije, posebno u sistemima sa heterogenom površinom. Ovaj model je prvobitno razvijen za opis adsorpcije gasova na čvrstim površinama, a kasnije je primenjen i na sisteme u tečnoj fazi. Njegov diferencijalni oblik dat je izrazom:

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha e^{-\beta q_t} \quad (6)$$

gde α ($\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) predstavlja početnu brzinu adsorpcije, dok β (g mg^{-1}) predstavlja konstantu povezanu sa desorpcijom, odnosno sa smanjenjem brzine adsorpcije tokom vremena usled povećanja pokrivenosti površine adsorbenta [253]. Integracijom jednačine (6) dobija se odgovarajući integralni oblik:

$$q_t = \frac{1}{\beta} (1 + \alpha \beta t) \quad (7)$$

2.5.2. Adsorpcione izoterme

Adsorpcione izoterme predstavljaju grafički prikaz odnosa između količine adsorbata vezanog za adsorbens i njegove ravnotežne koncentracije u fluidnoj fazi pri konstantnoj temperaturi. One omogućavaju uvid u prirodu interakcija između adsorbata i adsorbensa, kao i u karakteristike površine i afinitet materijala prema ispitivanim jedinjenjima, uključujući pesticide i druge organske molekule. Tokom vremena razvijen je veći broj matematičkih modela koji se koriste za opisivanje adsorpcionih ravnoteža. Među najčešće korišćenim dvoparametarskim modelima izdvajaju se Langmirov, Frojndlihov, Temkinov i Dubinin–Raduškevičev model. U daljoj analizi koriste se nelinearni oblici izoterma, obzirom da linearizacija može dovesti do odstupanja i manje pouzdanih procena parametara [259, 260].

Langmirov model je jedan od najčešće primenjivanih modela za opisivanje adsorpcione ravnoteže. Zasniva se na pretpostavci da se adsorpcija odvija na homogenoj površini sa konačnim brojem identičnih aktivnih mesta. Proces se ograničava na formiranje monosloja, pri čemu svako adsorpciono mesto može vezati samo jednu molekulu adsorbata, bez međusobnih interakcija između adsorbovanih vrsta. Matematički, Langmirova izoterma može se predstaviti sledećim izrazom:

$$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (8)$$

gde q_e (mg g^{-1}) označava ravnotežnu količinu adsorbata, C_e (mg dm^{-3}) njegovu ravnotežnu koncentraciju u rastvoru, $q_{\max}$ (mg g^{-1}) maksimalni kapacitet monosloja, a K_L ($\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1}$) Langmirovu konstantu povezanu sa afinitetom adsorbensa [261].

Frojndlihov model predstavlja empirijski pristup koji opisuje adsorpciju na heterogenim površinama. Za razliku od Langmuirovog modela, ne ograničava proces na monosloj i omogućava opis višeslojne adsorpcije na energetski nejednakim aktivnim mestima. Njegov matematički oblik dat je izrazom:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (9)$$

gde su K_F ($(\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})^{1/n}$) i n konstante koje opisuju kapacitet i intenzitet adsorpcije, respektivno [261]. Parametar K_F povezan je sa adsorpcionim kapacitetom adsorbensa, dok vrednost parametra n pruža informacije o povoljnosti adsorpcionog procesa i heterogenosti površine. Kada je $n > 1$, adsorpcija se smatra povoljnom, što ukazuje na visok afinitet adsorbensa prema adsorbatu i lako vezivanje molekula na površinu. Vrednosti n u opsegu od 1 do 10 najčešće se smatraju pokazateljem efikasne adsorpcije. Sa druge strane, vrednosti $n < 1$ ukazuju na nepovoljan adsorpcioni proces i slabije interakcije između adsorbata i adsorbensa.

Temkinov model uzima u obzir interakcije između adsorbovanih molekula i pretpostavlja da toplota adsorpcije opada linearno sa povećanjem pokrivenosti površine. Ovaj model se može izraziti relacijom:

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln K_T C_e \quad (10)$$

gde su K_T ($\text{dm}^3 \text{mg}^{-1}$) i b_T ($\text{J g mol}^{-1} \text{mg}^{-1}$) Temkinove konstante, T (K) temperatura, a R univerzalna gasna konstanta i iznosi $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ [259]. Dubinin-Raduškevičev model razvijen je na osnovu Polanijeve teorije potencijalne energije i koristi se za opisivanje adsorpcije u mikroporoznim sistemima. Pretpostavlja Gausovu raspodelu energije adsorpcije i omogućava procenu srednje slobodne energije procesa. Njegov nelinearni oblik dat je izrazom:

$$q_e = q_{DR} e^{-K_{DR} \varepsilon^2} \quad (11)$$

gde q_{DR} (mg g^{-1}) predstavlja maksimalni kapacitet adsorpcije, K_{DR} ($\text{mol}^2 \text{J}^{-2}$) konstantu povezanu sa energijom adsorpcije, dok je ε (J mol^{-1}) ($\varepsilon = RT \ln 1 + \frac{1}{C_e}$), T (K) temperatura, R univerzalna gasna konstanta i iznosi $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ [259].

$$\varepsilon = 1/\sqrt{2K_{DR}} \quad (12)$$

Vrednost parametra ε može pružiti informacije o dominantnom mehanizmu adsorpcije. Ukoliko je $\varepsilon < 8 \text{ kJ mol}^{-1}$, adsorpcioni proces se najčešće pripisuje fizičkoj adsorpciji, pri čemu dominiraju slabe međumolekulske interakcije, poput van der Valsovih sila, elektrostatičkih interakcija i vodoničnih veza. Sa druge strane, vrednosti $\varepsilon > 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ukazuju na značajniji doprinos hemisorpcije, odnosno procesa koji uključuju jače interakcije između adsorbata i adsorbensa, kao što su razmena elektrona, kompleksiranje ili formiranje hemijskih veza [262].

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I STRUKTURA DOKTRSKJE DISERTACIJE

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj integrisanog i održivog pristupa korišćenju biomase biljnih vrsta *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum* za dobijanje funkcionalnih materijala različite namene. Koncept istraživanja zasnovan je na sukcesivnom iskorišćenju iste biljne biomase, pri čemu su etanolni ekstrakti odabranih biljnih vrsta korišćeni za zelenu sintezu AgNPs, dok su čvrsti biljni ostaci preostali nakon ekstrakcije dalje korišćeni kao prekursori za dobijanje ugljeničnih materijala karbonizacijom. Na taj način uspostavljen je pristup potpunijem iskorišćenju polazne biomase, kojim se iz istog obnovljivog izvora dobijaju dve klase funkcionalnih materijala, u skladu sa principima zelene hemije, cirkularne ekonomije i održivog razvoja.

Prvi deo istraživanja bio je usmeren na zelenu sintezu AgNPs primenom etanolnih ekstrakata odabranih biljnih vrsta kao prirodnih redukcionih i stabilizacionih agenasa. Cilj ovog dela bio je optimizacija uslova sinteze i utvrđivanje uticaja vrste biljnog prekursora na fizičko-hemijska svojstva dobijenih nanočestica. U tom smislu izvršena je detaljna karakterizacija sintetisanih AgNPs radi određivanja njihovih optičkih, morfoloških, strukturnih i površinskih svojstava, kao i veličine, raspodele veličina i koloidne stabilnosti. Posebna pažnja posvećena je sagledavanju razlika između SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag koje mogu proisteći iz različitog hemijskog sastava biljnih ekstrakata i biomolekulskog omotača formiranog na površini nanočestica.

Poseban cilj ovog dela istraživanja bio je ispitivanje biološkog profila sintetisanih AgNPs i utvrđivanje u kojoj meri njihov biološki odgovor zavisi od biljnog prekursora korišćenog tokom sinteze. U tu svrhu ispitani su efekti nanočestica na ćelijsku vijabilnost i proliferaciju, produkciju ROS, učestalost mikronukleusa, proliferativni indeks i indukciju apoptoze. Ispitivanja su sprovedena na ćelijskim linijama normalnog i tumorskog porekla, čime je omogućeno sagledavanje koncentraciono zavisnih i ćelijski specifičnih odgovora. Dodatno je ispitan uticaj AgNPs na aktivnost AChE, sa ciljem procene njihovih interakcija sa enzimskim sistemima. Povezivanjem rezultata fizičko-hemijske karakterizacije i bioloških ispitivanja nastojalo se da se utvrdi u kojoj meri razlike u površinskim svojstvima, veličini, stabilnosti i agregacionom ponašanju nanočestica mogu biti povezane sa razlikama u njihovom biološkom delovanju, kao i da se sagledaju potencijal i moguća ograničenja njihove buduće primene u biohemijskim, biomedicinskim i farmaceutskim istraživanjima.

Drugi deo istraživanja odnosio se na dalje iskorišćenje čvrstih biljnih ostataka preostalih nakon ekstrakcije kroz njihovu konverziju u funkcionalne ugljenične materijale. Karbonizacija je sprovedena na 400 °C i 900 °C, sa ciljem da se ispita zajednički uticaj vrste biljnog prekursora i temperature karbonizacije na morfologiju, elementarni sastav, hemiju površine, specifičnu površinu, razvoj porozne strukture i površinsko naelektrisanje dobijenih materijala. Poređenjem materijala dobijenih pri dve različite temperature nastojalo se da se utvrdi u kojoj meri intenzitet termičke obrade određuje strukturnu reorganizaciju ugljenične matrice i razvoj svojstava značajnih za njihovu dalju primenu.

Poseban cilj ovog dela rada bio je ispitivanje mogućnosti primene sintetisanih ugljeničnih materijala za uklanjanje MB, RB, CV i MG iz vodenih rastvora. U okviru adsorpcionih ispitivanja analiziran je uticaj pH vrednosti, temperature, koncentracije adsorbensa i vremena kontakta na efikasnost uklanjanja boja. Kinetički eksperimenti i odgovarajući modeli korišćeni su za sagledavanje brzine procesa i mogućih ograničavajućih koraka prenosa mase, dok su ravnotežna ispitivanja i modeli adsorpcionih izoterma primenjeni radi procene adsorpcionih kapaciteta, afiniteta materijala i heterogenosti njihovih površina. Na taj način nastojalo se da se utvrdi u kojoj meri temperatura karbonizacije utiče ne samo na ukupni adsorpcioni kapacitet već i na brzinu adsorpcije i dostupnost adsorpcionih mesta.

Dodatni cilj bio je detaljnije razumevanje odnosa između strukturnih svojstava adsorbenasa i karakteristika adsorbata. U tom smislu, geometrijske i približne van der Waalsove dimenzije ispitivanih

boja upoređene su sa karakterističnim širinama pora određenim NLDFT analizom, uz razmatranje njihovog efektivnog poprečnog preseka, trodimenzionalne geometrije, konformacione fleksibilnosti i mogućnosti odgovarajuće orijentacije pri pristupu poroznoj mreži. Rezultati kinetičkih i ravnotežnih ispitivanja povezani su sa teksturalnim i površinskim svojstvima adsorbenasa i FTIR spektrima materijala pre i nakon adsorpcije, kako bi se sagledao relativni doprinos ispunjavanja pora i različitih nekovalentnih interakcija, uključujući π - π , elektrostatičke, hidrofobne i disperzione interakcije, kao i vodonične veze.

Poseban aspekt istraživanja odnosio se na procenu ponašanja odabranih ugljeničnih materijala u uslovima koji su bliži potencijalnoj praktičnoj primeni. Zbog toga su, pored ispitivanja u stacionarnim uslovima, adsorpciona svojstva analizirana i u dinamičkom režimu, korišćenjem protočnog sistema. Cilj je bio da se utvrdi u kojoj meri visoki adsorpcioni kapaciteti određeni u ravnotežnim uslovima odgovaraju efikasnosti materijala pri kraćem vremenu kontakta, kao i da se procene mogućnost desorpcije adsorbovanih boja, regeneracija adsorbenasa i očuvanje njihovih adsorpcionih svojstava tokom više uzastopnih adsorpciono-desorpcionih ciklusa. Na taj način ispitana je mogućnost višekratne upotrebe razvijenih materijala, ali i izdvajanja adsorbovanih boja nakon tretmana, što predstavlja važan aspekt održivosti procesa i upravljanja uklonjenim zagađujućim materijama.

Konačni cilj disertacije bio je da se objedinjavanjem rezultata dobijenih za obe klase materijala utvrdi značaj vrste biljne biomase za usmeravanje njihovih konačnih funkcionalnih svojstava. Nastojalo se da se pokaže da biomasa ne predstavlja samo izvor prirodnih redukcionih i stabilizacionih komponenti za sintezu AgNPs, odnosno izvor ugljenika za dobijanje adsorbenasa, već da njen specifičan hemijski sastav može značajno uticati na fizičko-hemijska i biološka svojstva nanočestica, kao i na strukturna, adsorpciona i regeneraciona svojstva ugljeničnih materijala. Time je uspostavljen integrisan koncept potpunijeg iskorišćenja istog obnovljivog biljnog izvora i njegovog sukcesivnog usmeravanja ka dobijanju materijala različite funkcionalne namene.

Ovakav pristup omogućava efikasnije korišćenje obnovljivih resursa, smanjenje količine preostalog biljnog materijala nakon ekstrakcije i razvoj regenerabilnih funkcionalnih materijala sa potencijalom za primenu u zaštiti životne sredine i biohemijskim istraživanjima. Koncept i rezultati disertacije u skladu su sa principima održivog razvoja i posebno doprinose ciljevima održivog razvoja Ujedinjenih nacija: SDG 6 – Čista voda i sanitarni uslovi, kroz razvoj materijala za uklanjanje zagađujućih materija iz vode; SDG 12 – Odgovorna proizvodnja i potrošnja, kroz potpunije iskorišćenje biomase, regeneraciju adsorbenasa i razmatranje ponovne upotrebe izdvojenih boja; kao i SDG 13 – Klimatska akcija, kroz razvoj procesa zasnovanih na obnovljivim sirovinama i mogućnost smanjenja energetske potrošnje pri izboru odgovarajućih uslova dobijanja funkcionalnih materijala.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Materijal

U svim eksperimentima korišćene su hemikalije analitičke čistoće. Srebro-nitrat (AgNO_3 , $\geq 99\%$), kalijum-hidroksid (KOH , $\geq 98\%$), natrijum-hidroksid (NaOH , $\geq 98\%$), hlorovodonična kiselina (HCl , 37%) i etanol ($\geq 99,8\%$) nabavljeni su od komercijalnih dobavljača (Merck, Darmstadt, Nemačka; Centrohem, Beograd, Srbija). Svi rastvori pripremani su korišćenjem dejonizovane vode ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Milli-Q sistem, Merck, Darmstadt, Nemačka). Kao biljni prekursori korišćeni su listovi *Saintpaulia ionantha*, zeleni plodovi *Juglans regia* i plodovi *Allium sativum*, koji su nabavljeni na lokalnoj pijaci i korišćeni bez dodatnog hemijskog prečišćavanja pre procesa ekstrakcije. Za biohemijska ispitivanja korišćeni su acetilholinesteraza iz električne jegulje (specifična aktivnost 288 IU mg^{-1}), acetilholin-jodid (AChI) i 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva) kiselina (DTNB), nabavljeni od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD).

Model jedinjenja u adsorpcionim ispitivanjima bile su katjonski boje: MB, RB, CV i MG (Sigma-Aldrich, Soborg, Denmark, čistoća $\geq 90\%$), korišćeni bez dodatnog prečišćavanja.

4.1.1. Priprema etanolnih ekstrakata

Etanolni ekstrakti pripremljeni su korišćenjem listova *Saintpaulia ionantha*, zelenih plodova *Juglans regia* i čenova *Allium sativum*. Biljni materijal je potopljen u 100% etanol u masenom odnosu 1:4 i ostavljen na tamnom mestu tokom šest nedelja, na sobnoj temperaturi. Nakon završetka ekstrakcije, tečna faza je odvojena od čvrste filtracijom. Dobijeni ekstrakti korišćeni su za sintezu AgNPs, dok su čvrsti ostaci dalje upotrebljeni kao prekursori za sintezu ugljeničnih materijala.

4.1.2. Zelena sinteza srebrnih nanočestica

AgNPs sintetisane su primenom zelene sinteze, korišćenjem etanolnih ekstrakata kao redukcionih i stabilizacionih agenasa. U sintezi su korišćeni ekstrakti *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum*, prethodno razblaženi 150 puta destilovanom vodom. U postupku sinteze, 89 mL razblaženog ekstrakta pomešano je sa 1 mL rastvora KOH koncentracije 1 mol dm^{-3} i 10 mL rastvora AgNO_3 koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Reakciona smeša je zagrevana na grejnoj ploči tokom 15 min. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, dobijena koloidna suspenzija je centrifugirana dva puta pri 6000 rpm radi izdvajanja nanočestica. Istaložene SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag su sakupljene i čuvane u Falcon epruvetama na 4°C do dalje upotrebe.

4.1.3. Sintaza ugljeničnih materijala karbonizacijom biljnih ostataka

Čvrsti ostaci nakon ekstrakcije korišćeni su kao prekursori za sintezu ugljeničnih materijala. Uzorci su prethodno sušeni u sušnici na 90°C tokom 24 h. Karbonizacija je sprovedena u električnoj cevnoj peći (Protherm Furnaces, Ankara, Turska) u atmosferi azota. Temperatura je povećavana brzinom od $5^\circ \text{C min}^{-1}$ do 400°C ili 900°C , nakon čega je održavana konstantnom tokom 1 h. Na taj način dobijeno je ukupno šest materijala (tri prekursora $\times$ dve temperature karbonizacije). Nakon karbonizacije, materijali su usitnjeni i prosejani kroz sito veličine pora $100 \mu\text{m}$ radi dobijanja homogenog praha. Dobijeni prah je zatim ispiran rastvorima $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$, $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$ i dejonizovanom vodom.

(Milli-Q sistem, Merck KGaA, Darmštadt, Nemačka; otpornost 18,2 MΩ cm) do neutralne pH vrednosti. U završnoj fazi, materijali su dispergovani u dejonizovanoj vodi, pri čemu su pripremljene suspenzije koncentracije 2 mg mL⁻¹ za dalja ispitivanja.

4.2. Metode

4.2.1. Karakterizacija srebrnih nanočestica

Morfologija i elementarni sastav AgNPs, uključujući elementarno mapiranje, ispitivani su primenom skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (eng. *Field Emission Scanning Electron Microscopy* - FESEM) u kombinaciji sa energetske-disperzivnom rendgenskom spektroskopijom (eng. *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* - EDX), korišćenjem mikroskopa FEI Scios 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). FESEM snimci i EDX spektri dobijeni su u uslovima visokog vakuuma pri ubrzanom naponu od 10 kV.

Koncentracija srebra u koloidnim suspenzijama određena je metodom induktivno spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (eng. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy* - ICP-OES) na instrumentu Thermo Scientific iCAP 7000 Series (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), čime je omogućena kvantitativna analiza sadržaja metala u sistemu.

Funkcionalne grupe na površini AgNPs analizirane su Infracrvenom spektroskopijom sa Fourier-ovom transformacijom (eng. *Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR, Nicolet iS20, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), u opsegu 400-2000 cm⁻¹, uz 64 akumulirana skeniranja i rezoluciju od 4 cm⁻¹.

Kristalna struktura i stepen uređenosti nanočestica ispitani su rendgenskom difrakcijom (eng. *X-ray diffraction* - XRD) primenom Cu K_α zračenja ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), u opsegu difrakcionih uglova (2θ) 10-80°, radi identifikacije faza.

Površinski zeta potencijal određen je pomoću Nano ZS Zetasizer sistema (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija), sa He-Ne laserom talasne dužine 633 nm. Hidrodinamička veličina i raspodela veličina nanočestica određene su metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering*-DLS), na istom uređaju. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja, a rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti.

4.2.2. Ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog potencijala sintetisanih nanočestica

Ispitivanje biološkog potencijala SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag dobijenih metodom zelene sinteze, uz korišćenje etanolnih ekstrakata *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum*, sprovedeno je u *in vitro* uslovima. U eksperimentima su korišćene komercijalno dostupne humane ćelijske linije normalnog i tumorskog porekla: TK6 (humana limfoblastoidna ćelijska linija; 95111735, ECACC/Sigma-Aldrich-Merck), MRC-5 (normalni humani fibroblasti pluća; CCL-171, ATCC, Manassas, VA, SAD), HeLa (adenokarcinom grlića materice; CCL-2, ATCC, Manassas, VA, SAD) i A549 (adenokarcinomni epitel pluća; CCL-185, ATCC, Manassas, VA, SAD).

4.2.2.1. Kultivacija i priprema ćelijskih linija

Za održavanje ćelijskih linija korišćeni su specifični hranljivi medijumi: TK6 ćelije su gajene u RPMI-1640 medijumu (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD), dok je za MRC-5, HeLa i A549 linije korišćen *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD). Svi

medijumi su suplementirani sa 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal bovine serum* - FBS) (Capricorn Scientific, Nemačka) i po potrebi sa 1% antibiotika (penicilin/streptomycin) (Capricorn Scientific, Nemačka).

Kulture su održavane u inkubatoru (Esco Lifesciences Group, Singapur) pod standardnim uslovima, na temperaturi od 37 °C, u atmosferi sa 5% CO₂ i uz održavanje visokog stepena vlažnosti do postizanja optimalne gustine ćelija (za suspenzionu liniju TK6) ili adekvatne konfluencije (za adherentne linije MRC-5, HeLa i A549).

Suspenziona ćelijska linija TK6 pripremljena je direktnim resuspendovanjem ćelijske kulture u svežem RPMI-1640 medijumu. Kod adherentnih ćelijskih linija, nakon uklanjanja kultivacionog medijuma, ćelije su ispirane sterilnim fiziološkim rastvorom, a potom odvojene od podloge primenom 0,05 % tripsin-EDTA rastvora (Capricorn Scientific, Nemačka). Proces tripsinizacije je zaustavljen dodatkom svežeg kompletnog medijuma sa 10% FBS.

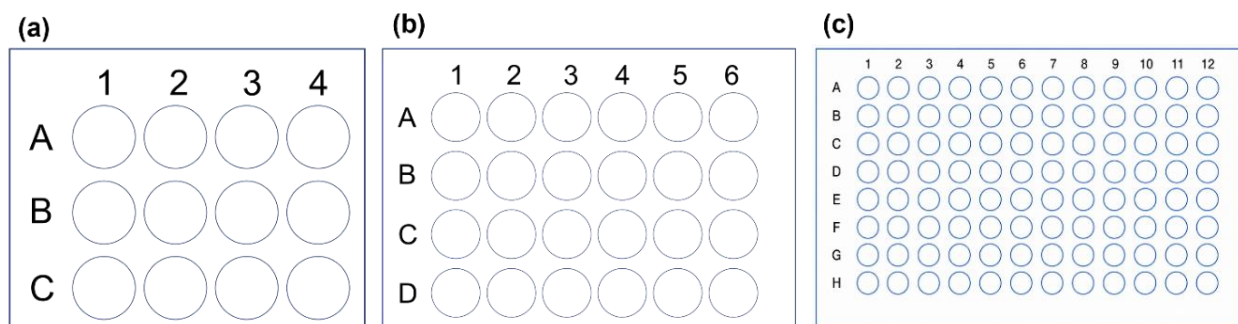
Broj živih ćelija po mililitru suspenzije određen je metodom bojenja tripan-plavo [263]. Suspenzija ćelija je mešana sa 0,4% rastvorom boje u odnosu 1:1 (v/v), nakon čega je uzorak nanošen na hemocitometar (Cambridge Instruments Inc., SAD). Brojanje je vršeno pod svetlosnim mikroskopom (Optech, Nemačka) pri uveličanju od 400×. Žive ćelije, koje nisu primile boju usled očuvanog integriteta membrane, izbrojane su u četiri ugaona kvadrata Neubauerove komore.

Ukupan broj ćelija po mililitru suspenzije računat je prema formuli:

$$\text{Br. ćelija/mL} = n \times 10^4 \times R \quad (13)$$

gde su: n – srednja vrednost broja ćelija u četiri ugaona kvadrata Neubauerove komore, R – faktor korekcije za razblaženje uzorka bojom (R = 2), a vrednost 10⁴ predstavlja faktor korekcije zapremine.

Nakon potvrde adekvatne vijabilnosti (>95%), pripremljene su suspenzije odgovarajuće gustine za zasejavanje u mikrotitarske ploče sa 12, 24 ili 96 bunarića (Thermo Fisher Scientific, SAD) (Slika 8). Ćelije su inkubirane 24 h pod standardnim uslovima (37°C u atmosferi sa 5% CO₂) kako bi se omogućila njihova adhezija i uspostavila stabilna kultura, nakon čega je izvršen tretman gradijentom koncentracija sintetisanih AgNPs.



Slika 8. Šematski prikaz mikrotitar ploča sa: a) 12 bunarića, b) 24 bunarića i c) 96 bunarića

4.2.2.2. Priprema suspenzija nanočestica srebra i tretman ćelija

Ispitivane AgNPs, suspendovane su neposredno pre tretmana u odgovarajućim medijumima za kultivaciju. Za TK6 ćelije suspenzije su pripremane u RPMI-1640 medijumu, dok su za linije MRC-5, HeLa i A549 pripremane u DMEM medijumu.

U cilju postizanja uniformne disperzije i sprečavanja agregacije AgNPs, suspenzije su homogenizovane vorteksovanjem. Iz osnovnih (štok) suspenzija, serijskim razblaženjem dobijene su radne koncentracije.

Ćelije su tretirane gradijentom koncentracija u opsegu od 0,01 ppm do 50 ppm, sa ciljem procene koncentraciono-zavisnog efekta. Eksperimentalni dizajn obuhvatio je negativnu kontrolu (netretirane ćelijske kulture održavane u odgovarajućem kompletnom medijumu) i pozitivnu kontrolu (ćelije tretirane mitomicinom C (MMC) (Sigma-Aldrich, Nemačka). MMC je korišćen kao referentni klastogeni agens za potvrdu osetljivosti testa, dok su efekti AgNPs interpretirani u odnosu na negativnu kontrolu i koncentraciono-zavisni odgovor.

Kako bi se obezbedila statistička pouzdanost i ponovljivost rezultata, svi eksperimenti su izvedeni u tri nezavisna ponavljanja.

4.2.2.3. Citokinezis-blok mikronukleus test i određivanje citokinezis-blok proliferativnog indeksa

Genotoksični potencijal sintetisanih AgNPs analiziran je primenom CBMN testa na TK6 ćelijskoj liniji [264].

TK6 ćelije su gajene i tretirane na prethodno pomenut način. Nakon određivanja broja i vijabilnosti ćelija, pripremljena je ćelijska suspenzija gustine 2×10^5 ćelija mL^{-1} , koja je zasejana u mikrotitarske ploče sa 12 bunarića. Nakon perioda stabilizacije od 2 h, ćelije su tretirane suspenzijama SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag u ispitivanom koncentracionom opsegu. Pozitivna kontrola je postavljena u koncentraciji 0,5 μM , dok su netretirane kulture služile kao negativna kontrola. Svi tretmani su postavljeni u tri nezavisna ponavljanja.

Nakon 24 h inkubacije sa ispitivanim suspenzijama, u kulture je dodat citohalazin B (štok rastvor) do finalne koncentracije od 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, čime je omogućena blokada citokineze i akumulacija binukleusnih ćelija. Ćelije su zatim inkubirane dodatnih 24 h.

Nakon završene inkubacije, ćelije su prebačene u epruvete i podvrgnute hipotoničnom tretmanu dodatkom jednake zapremine 0,56% rastvora KCl. Između svih koraka obrade, ćelije su centrifugirane (5 min na 1000 rpm), a supernatant je aspiriran. Prva fiksacija izvršena je smešom metanol : glacijalna sirćetna kiselina : fiziološki rastvor u odnosu 5:1:6. Finalna fiksacija sprovedena je hladnom smešom metanola i glacijalne sirćetne kiseline (5:1) uz vorteksovanje. Postupak fiksacije je ponavljan 4-5 puta do dobijanja čistog taloga, nakon čega su uzorci čuvani u fiksativu na 4°C tokom 24 h.

Narednog dana, talog je resuspendovan, a homogena suspenzija ćelija naneta je na prethodno očišćena i obeležena predmetna stakla. Preparati su osušeni na vazduhu i obojeni 2% rastvorom Gimza boje (Sigma-Aldrich, Nemačka). Mikroskopska analiza izvršena je svetlosnim mikroskopom (Optech, Nemačka) pri uveličanju od 400× i 1000×. Analiza MN sprovedena je u binukleusnim ćelijama (BN), pri čemu je za procenu genotoksičnosti analizirano najmanje 2000 BN ćelija po uzorku, u skladu sa standardnim kriterijumima za identifikaciju mikronukleusa [265].

Proliferativni potencijal TK6 ćelija *in vitro* procenjivan je izračunavanjem CBPI [266]. Za određivanje ovog indeksa korišćeni su isti citološki preparati na kojima je vršena analiza MN, što je omogućilo direktnu korelaciju genotoksičnosti i citostatskog efekta unutar iste eksperimentalne serije.

Mikroskopski pregled preparata vršen je svetlosnim mikroskopom pri uveličanju od 400×. Prema preporukama OECD (2023) [265] po svakom uzorku je analizirano najmanje 500 ćelija. Tokom analize, ćelije su klasifikovane na osnovu broja prisutnih jedara u citoplazmi na:

- mononukleusne (ćelije koje nisu ušle u deobu),
- binukleusne (ćelije koje su završile jednu jedarnu deobu),
- trinukleusne i tetranukleusne ćelije (ćelije koje su prošle kroz dve ili više deoba).

Sve analize su izvedene u tri nezavisna ponavljanja.

Vrednost CBPI indeksa služi kao precizan pokazatelj citostatskog efekta ispitivanih AgNPs, ukazujući na potencijalno usporavanje ili zastoj u ćelijskom ciklusu kao odgovor na primenjeni tretman

i predstavlja prosečan broj ćelijskih deoba kroz koji prođe populacija ćelija tokom perioda blokade citokineze, Vrednost CBPI indeksa je izračunata prema sledećoj formuli:

$$CBPI = (M_I + 2M_{II} + 3[M_{III} + M_{IV}])/N \quad (14)$$

gde su: $M_I - M_{IV}$ – broj ćelija sa jednim, dva, tri, odnosno četiri jedra i N – ukupan broj analiziranih ćelija.

4.2.2.4. Analiza apoptoze i ćelijskog ciklusa

Analiza apoptoze kod TK6 ćelija sprovedena je metodom bojenja propidijum-jodidom (PI) uz primenu protočne citometrije. Metoda se zasniva na stehiometrijskom vezivanju PI za molekule DNK, što omogućava kvantifikaciju sadržaja genetičkog materijala i razlikovanje populacija ćelija u različitim fazama ciklusa: G_1/G_0 (2n), S (između 2n i 4n) i G_2/M (4n). Apoptotske ćelije se, usled fragmentacije DNK i gubitka niskomolekulskih fragmenata (tzv. *leakage* efekat), detektuju kao populacija sa smanjenim sadržajem DNK, poznata kao sub- G_1 populacija.

TK6 ćelije su kultivisane u RPMI-1640 medijumu sa dodatkom 10 % FBS, bez dodatka antibiotika i antimikotika. Nakon određivanja vijabilnosti, pripremljena je suspenzija gustine 2×10^5 ćelija mL^{-1} . Ćelije su zasejane u mikrotitarske ploče sa 12 bunarića i tretirane suspenzijama ispitivanih AgNPs u koncentracionom opsegu od 0,01 do 50 ppm.

Nakon inkubacije 24h, ćelije su centrifugirane (5 min na 1000 rpm) i isprane dva puta u PBS puferu (pH 6,8). Fiksacija je izvršena dodavanjem hladnog 70% etanola, kap po kap, uz konstantno vorteksovanje radi sprečavanja agregacije. Uzorci su fiksirani na 4°C tokom 24 h.

Neposredno pre analize, uzorci su isprani PBS puferom radi uklanjanja etanola, a talog je resuspendovan u PBS/RNaza/PI rastvoru (finalne koncentracije: RNaza 100 $\mu g mL^{-1}$ i PI 50 $\mu g mL^{-1}$). Uzorci su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetlosti.

Analiza je vršena na protočnom citometru Partec, detekcijom fluorescencije PI u FL2-A kanalu. Tokom obrade podataka vršena je diskriminacija dubleta (isključivanje agregata ćelija) kako bi se osigurala analiza pojedinačnih događaja.

Apoptoza je kvantifikovana kao procenat ćelija u sub- G_1 regionu u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

4.2.2.5. Testovi citotoksičnosti

1. Određivanje citotoksičnosti primenom ABCAM testa

Citotoksični efekat ispitivanih nanočestica određen je primenom komercijalnog kolorimetrijskog testa *Cell Cytotoxicity Assay Kit* (ab112118, Abcam, UK). Metoda se zasniva na redukciji vodorastvorljivog indikatorskog reagensa unutar metabolički aktivnih ćelija. Prilikom redukcije dolazi do promene boje reagensa i modifikacije njegovog apsorpcionog spektra, pri čemu je intenzitet promene direktno proporcionalan broju živih, vijabilnih ćelija u uzorku.

Sve ćelijske linije (TK6, MRC-5, HeLa i A549) su zasejane u mikrotitarske ploče sa 96 bunarića u gustini od 1×10^4 ćelija po bunariću. TK6 ćelije su zasejane u 100 μL kompletnog RPMI-1640 medijuma i tretirane nakon 2 h stabilizacije, dok su adherentne linije zasejane u kompletnom DMEM medijumu. Tretman je izvršen 24 h nakon zasejavanja, čime je omogućen potpun oporavak i adhezija ćelija za podlogu.

Ćelije su tretirane suspenzijama ispitivanih AgNPs u koncentracionom opsegu od 0,01 ppm do 50 ppm. Kao pozitivna kontrola korišćen je MMC, dok su netretirane ćelije služile kao negativna kontrola. Svi tretmani su izvedeni u tri nezavisna ponavljanja.

Nakon 24 h inkubacije sa tretmanima (37 °C, 5% CO₂), u svaki bunarić je dodato po 20 µL *Assay Solution* reagensa. Ploče su inkubirane na 37 °C do pojave jasne promene boje, nakon čega je merena apsorbancija pomoću mikrotitar čitača na talasnim dužinama od 570 nm i 605 nm.

Vijabilnost i citotoksičnost su izračunate prema sledećim formulama:

$$\text{Vijabilnost ćelija (\%)} = \left[\frac{\left(\frac{\text{OD}_{570}}{\text{OD}_{605}} \right)_{\text{tretman}} - \left(\frac{\text{OD}_{570}}{\text{OD}_{605}} \right)_{\text{blank}}}{\left(\frac{\text{OD}_{570}}{\text{OD}_{605}} \right)_{\text{kontrola}} - \left(\frac{\text{OD}_{570}}{\text{OD}_{605}} \right)_{\text{blank}}} \right] \times 100 \quad (15)$$

$$\text{Citotoksičnost (\%)} = 100 - \text{Vijabilost ćelija (\%)} \quad (16)$$

gde je OD₅₇₀/OD₆₀₅_{tretman} odnos optičkih gustina uzorka merenih na 570 i 605 nm nakon tretmana AgNPs, OD₅₇₀/OD₆₀₅_{kontrola} odnos optičkih gustina za kontrolni uzorak bez dodatka nanočestica, a OD₅₇₀/OD₆₀₅_{blank} prosečni odnos apsorbancija pozadinske kontrole (kontrole bez ćelija). Oznaka OD (engl. *Optical Density*) predstavlja optičku gustinu, odnosno apsorbancu merenu na odgovarajućoj talasnoj dužini i nema mernu jedinicu. Vijabilnost ćelija izražena je u procentima i predstavlja procenat metabolički aktivnih ćelija u odnosu na kontrolu, koja se smatra 100% vijabilnom. Citotoksičnost je takođe izražena u procentima i predstavlja procenat ćelija čija je vijabilnost smanjena usled izlaganja ispitivanim AgNPs.

Dobijene vrednosti omogućile su evaluaciju koncentraciono-zavisnog citotoksičnog efekta nanočestica na ispitivanim ćelijskim linijama.

2. Određivanje citotoksičnosti sulforodamin B testom

Citotoksični efekat AgNPs na adherentnim ćelijskim linijama (MRC-5, A549 i HeLa) procenjen je primenom kolorimetrijskog sulforodamin B (SRB) testa [267]. Ova metoda se zasniva na sposobnosti anjonske boje SRB da se elektrostatički vezuje za bazne amino-kiselinske ostatke proteina u ćelijama fiksiranim trihlorsirćetnom kiselinom (TCA). Budući da je količina vezane boje direktno proporcionalna ukupnoj proteinskoj masi, odnosno broju prisutnih ćelija, test se koristi za preciznu kvantifikaciju vijabilnosti i proliferacije.

Ćelije su zasejane u mikrotitarske ploče sa 96 bunarića u gustini od 1×10⁴ ćelija po bunariću u 100 µL kompletnog DMEM medijuma. Nakon 24 h inkubacije (37 °C, 5% CO₂) i formiranja ćelijskog monosloja, izvršen je tretman suspenzijama SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag u rasponu koncentracija od 0,01 do 50 ppm.

Nakon 24 h inkubacije sa ispitivanim uzorcima, ćelije su fiksirane dodatkom 10% TCA. Ploče su zatim inkubirane 1 h na 4 °C, nakon čega su bunarići isprani dejonizovanom vodom i potpuno osušeni.

Fiksirani proteinski sadržaj obojen je dodatkom 0,057% rastvora SRB (pripremljenog u 1% sirćetnoj kiselini) tokom 30 min na sobnoj temperaturi. Višak nevezane boje uklonjen je višekratnim ispiranjem 1% rastvorom sirćetne kiseline.

Vezana boja je solubilizovana dodatkom 10 mM Tris pufera (pH 10,5). Intenzitet obojenja meren je spektrofotometrijski na mikrotitar čitaču na talasnoj dužini od 510 nm. Vijabilnost i citotoksičnost su izračunate prema formulama:

$$\text{Vijabilnost \u0107elija (\%)} = (\text{OD}_{510\text{tretman}}/\text{OD}_{510\text{kontrola}}) \times 100 \quad (17)$$

$$\text{Citotoksi\u010dnost (\%)} = 100 - \text{Vijabilost \u0107elija (\%)} \quad (18)$$

4.2.2.6. Odre\u011divanje produkcije intracelularnih reaktivnih vrsta kiseonika

Intracelularna produkcija reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species* – ROS) merena je primenom fluorescentnog DCF testa, kori\u0161ćenjem \u0107elijski permeabilne probe DCFH-DA. Princip metode zasniva se na pasivnoj difuziji DCFH-DA kroz \u0107elijsku membranu, gde se pod dejstvom unutar\u0107elijskih esteraza vr\u0161i deacetilacija u nefluorescentni DCFH. U prisustvu intracelularnih ROS, DCFH se oksiduje u visoko fluorescentni oblik, DCF, \u0107iji je intenzitet emisije direktno proporcionalan nivou generisanih reaktivnih vrsta.

\u0107elije su zasejane u mikrotitarske plo\u0107e sa 96 bunari\u0107a u gustini od $2,5 \times 10^4$ \u0107elija po bunari\u0107u u odgovaraju\u0107em kompletnom medijumu (RPMI-1640 za TK6; DMEM za MRC-5, A549 i HeLa). Nakon 24 h inkubacije (37 \u00b0C, 5% CO₂) i formiranja \u0107elijskog monosloja, \u0107elije su inkubirane sa 100 \u00b5L 20 \u00b5M DCFH-DA probe (rastvorene u 1 x HBSS sa 10%FBS) tokom 45 min na 37\u00b0C, za\u0161ti\u0107ene od svetlosti. Po zavr\u0161etku inkubacije, \u0107elije su isprane PBS puferom kako bi se uklonila ekstracelularna proba. Nakon ispiranja, \u0107elije su tretirane suspenzijama AgNPs u rasponu koncentracija od 0,01 do 50 ppm.

Validnost testa osigurana je upotrebom negativne kontrole (netretirane \u0107elije u medijumu) i pozitivne kontrole (H₂O₂ u koncentraciji od 200 \u00b5M). Svi tretmani i kontrole su izvedeni u tri nezavisna ponavljanja.

Intenzitet fluorescencije meren je nakon 4 sata tretmana pomo\u0107u mikrotitar \u0107ita\u0107a pri ekscitacionoj talasnoj du\u017einu od 485 nm i emisionoj talasnoj du\u017einu od 535 nm. Relativni nivo ROS izra\u0107unat je prema formuli:

$$\text{Relativni nivo ROS (\%)} = F_{\text{tretman}}/F_{\text{kontrola}} \quad (20)$$

gde F predstavlja intenzitet fluorescencije DCF-a. Dobijeni rezultati omogu\u0107ili su procenu prooksidativnog potencijala ispitivanih AgNPs u zavisnosti od primenjene doze.

4.2.2.7. Ispitivanje uticaja srebrnih nano\u0107estica na aktivnost acetilholinesteraze

Uticaj sintetisanih AgNPs na aktivnost AChE procenjivan je primenom modifikovane Elmanove metode[268]. Komercijalno pre\u0107i\u0161\u0107ena AChE iz elektri\u0107ne jegulje (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) kori\u0161\u0107ena je iz po\u0107etnog rastvora koncentracije 100 U mL⁻¹, dok je za ispitivanja pripreman radni rastvor enzima. Pre kona\u0107nog odabira uslova, varirana je koncentracija AChE u opsegu od 0,5 do 2,5 U mL⁻¹. Koncentracija AChE od 1 U mL⁻¹ je izabrana, jer je pri toj vrednosti apsorbanca kontrolnog uzorka bila pribli\u017ano 1.

Reakciona sme\u0161a sadr\u017eala je 65 \u00b5L uzorka, odnosno suspenzije AgNPs, 545 \u00b5L 50 mmol dm⁻³ fosfatnog pufera (Merck KGaA, Darmstadt, Nema\u0107ka) pH 8,0 i 10 \u00b5L rastvora AChE. Vreme preinkubacije enzima sa uzorkom varirano je od 5 do 60 minuta, pri \u0107emu je kao optimalno odabrano 20 minuta. Nakon preinkubacije dodat je DTNB reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u zapremini od 20 \u00b5L, a pet minuta kasnije reakcija je pokrenuta dodatkom 10 \u00b5L acetilholin-jodida (AChI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), koncentracije 0,075 mol dm⁻³. Enzimska reakcija odvijala se 8 minuta na 37 \u00b0C, nakon \u0107ega je zaustavljena dodatkom 50 \u00b5L 10% natrijum-dodecil sulfata (SDS).

Tioholin, nastao hidrolizom AChI pod dejstvom AChE, reaguje sa DTNB-om pri čemu se formira 5-tio-2-nitrobenzoat, čija je apsorbancija merena na 412 nm korišćenjem UV–VIS spektrofotometra Perkin Elmer Lambda 35 (Perkin Elmer, Traiskirchen, Austrija).

Kontrolni uzorak pripreman je bez dodatka AgNPs i sadržao je 610 µL fosfatnog pufera i 10 µL enzima, dok je slepa proba (blank) pripremana bez enzima i sadržala 620 µL fosfatnog pufera.

Inhibicija AChE izračunavana je prema jednačini:

$$\text{Inhibicija AChE (\%)} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (21)$$

gde A_0 predstavlja apsorbancu na 412 nm u kontrolnom uzorku, odnosno u odsustvu AgNPs, dok A označava apsorbancu na 412 nm nakon izlaganja AgNPs.

4.2.2.8. Statistička analiza podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u tri nezavisna ponavljanja za svaku eksperimentalnu grupu i primenjenu koncentraciju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

Statistička analiza dobijenih podataka izvršena je primenom jednofaktorske analize varijanse (one-way ANOVA). Za višestruka poređenja između svih ispitivanih koncentracija i kontrolne grupe, kao i između tretmana različitim nanočesticama, korišćen je post-hoc Tukey HSD test.

Poređenja između pozitivnih kontrola (MMC i H_2O_2) i pojedinačnih eksperimentalnih grupa, izvršena su primenom Studentovog t-testa za nezavisne uzorke. Za procenu povezanosti između analiziranih parametara primenjena je Pearsonova i parcijalna korelaciona analiza.

Nivo statističke značajnosti postavljen je na $p < 0,05$, a dobijene vrednosti označene su na sledeći način: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Statistička obrada podataka i grafički prikaz rezultata sprovedeni su korišćenjem softverskih paketa GraphPad Prism 8, Statistica 8.0 i OriginPro 2016 za Windows 11.

4.2.3. Karakterizacija ugljeničnih materijala

Morfologija i površinska struktura ugljeničnih materijala ispitivane su skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) korišćenjem mikroskopa Phenom ProX (Phenom-World B.V., Eindhoven, Holandija), u kombinaciji sa EDX, koja je korišćena za određivanje elementarnog sastava i prostorne raspodele elemenata. SEM analize su sprovedene pri različitim uvećanjima ($1000\times$, $5000\times$ i $10.000\times$), radi detaljnog uvida u morfologiju površine i razvoj porozne strukture nakon procesa karbonizacije.

Specifična površina, zapremina pora i raspodela veličine pora određeni su izotermalnom adsorpcijom azota na 77 K korišćenjem sistema Autosorb-iQ (Anton Paar QuantaTec Inc., Austrija). Pre merenja, uzorci su degazirani na 200 °C tokom najmanje 2 h u vakuumskim uslovima. Specifična površina izračunata je primenom Brunauer–Emmett–Teller (BET) metode, dok je raspodela veličine pora određena primenom nelinearne teorije funkcionala gustine (NLDFT).

FTIR spektroskopija, XRD analiza i merenje zeta potencijala ugljeničnih materijala sprovedeni su primenom istih instrumentalnih metoda i eksperimentalnih uslova koji su detaljno opisani u Poglavlju 4.2.1.

4.2.4. Adsorpcioni eksperimenti

4.2.4.1. Adsorpcija pri stacionarnim uslovima

Adsorpciona svojstva sintetisanih ugljeničnih materijala u uklanjanju katjonskih boja iz vodenih rastvora ispitivana su u definisanim eksperimentalnim uslovima. Kao model jedinjenja korišćene su katjonske boje MB, RB, CV i MG. Adsorbenti dobijeni iz različitih prekursora na temperaturama 400 °C i 900 °C označeni su kao SI400/SI900, JR400/JR900 i AS400/AS900, dok su njihove suspenzije pripremljene prema proceduri opisanoj u Poglavlju 4.1.3. Radni rastvori boja pripremani su razblaživanjem odgovarajućih početnih rastvora, nakon čega su mešani sa suspenzijama adsorbenata u odnosu 1:1. Na ovaj način postignute su konačne koncentracije adsorbenata u opsegu od 0,2 do 5 mg mL⁻¹, dok su koncentracije boja varirane u intervalu od 5×10^{-5} do 1×10^{-2} mol dm⁻³.

Dobijeni sistemi su podvrgnuti mešanju na orbitalnom šejkeru (Orbital Shaker Incubator Grant-bio ES-20) na 170 rpm pri kontrolisanim uslovima temperature (25-40 °C) i vremena kontakta (0-24 h). Nakon završetka adsorpcije, razdvajanje čvrste i tečne faze izvršeno je centrifugiranjem na 14.500 rpm u trajanju od 1 min (MiniSpin PLUS, Eppendorf). Supernatanti su zatim prikupljeni i analizirani UV-Vis spektrofotometrom (Perkin Elmer Lambda 35). Preostala koncentracija boje određena je praćenjem apsorbance na maksimalnoj talasnoj dužini ($\lambda_{\max}$) karakterističnoj za svaku boju. Kontrolni eksperimenti sprovedeni su u identičnim uslovima, ali bez prisustva adsorbenta. Sva merenja izvedena su u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.

Efikasnost adsorpcije procenjena je na osnovu ravnotežne koncentracije (c_e), adsorbovane koncentracije (c_a) i količine boje adsorbovane po jedinici mase adsorbenta u vremenu t (q_t), pri čemu su navedeni parametri izračunati prema sledećim izrazima:

$$\text{Efikasnost uklanjanja [\%]} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100\% \quad (22)$$

$$c_e = \frac{A}{A_0} \times c_0 \quad (23)$$

$$c_a = c_0 - c_e \quad (24)$$

$$q_t = \frac{c_a \times M}{\gamma} \quad (25)$$

gde A_0 predstavlja apsorbancu rastvora boje na $\lambda_{\max}$ u odsustvu adsorbenta, dok A predstavlja apsorbancu nakon procesa adsorpcije. c_0 , c_e i c_a odgovaraju početnoj, ravnotežnoj i adsorbovanoj koncentraciji boje (mol dm⁻³), redom. M označava molarnu masu boje (mg mol⁻¹), dok γ predstavlja koncentraciju adsorbenta (g dm⁻³).

Da bi se ispitao uticaj eksperimentalnih parametara na adsorpcionu efikasnost, pojedinačne varijable su menjane kontrolisano, dok su svi ostali uslovi održavani konstantnim (pH = 7, T = 25 °C, $c_{\text{mat}} = 1$ mg mL⁻¹, $c_0 = 5 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ i $t = 60$ min, ukoliko nije drugačije navedeno). Uticaj pH vrednosti ispitivan je u opsegu od 3 do 11, temperatura u intervalu od 25 do 40 °C, koncentracija adsorbenta od 0,2 do 5 mg mL⁻¹, dok je vreme kontakta varirano od 1 min do 24 h.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja uticaja eksperimentalnih parametara su određeni optimalni uslovi za dalja ispitivanja.

Eksperimentalni podaci dobijeni nakon variranja vremena kontakta obrađeni su primenom kinetičkih modela PFO, PSO, Elovičevog modela i IPD (Poglavlje 2.5.1.) dok su eksperimentalni podaci dobijeni variranjem početne koncentracije adsorbata pri ravnotežnim uslovima obrađeni primenom nelinearnih modela adsorpcionih izoterma: Frojndlihovog, Langmirovog, Temkinovog i Dubinin–Raduškevičevog modela (Poglavlje 2.5.2.).

4.2.4.2. Adsorpcija pri dinamičkim uslovima, regeneracija i ponovna upotreba

Adsorpcija pri dinamičkim uslovima, kao i sposobnost regeneracije i ponovne upotrebe odabranih materijala i boja, ispitivani su u uslovima koji simuliraju protočne sisteme, korišćenjem najlonskih špric filtera napunjenih sa 5 mg adsorbenta. Kroz filter je propušten 1 mL rastvora boja koncentracije 5×10^{-5} mol dm⁻³, nakon čega je merena apsorbancija filtrata UV–Vis spektrofotometrijom na $\lambda_{\max}$ karakterističnoj za svaku boju, radi određivanja preostale koncentracije i efikasnosti uklanjanja.

Nakon svakog ciklusa adsorpcije, izvršena je regeneracija materijala ispiranjem sa 1 mL 50% rastvora etanola, čime je omogućeno uklanjanje adsorbovanih molekula i obnavljanje aktivnih mesta na površini adsorbenta. Nakon regeneracije, isti materijal je ponovo korišćen u sledećem ciklusu adsorpcije pod identičnim eksperimentalnim uslovima. Ovaj postupak adsorpcije i desorpcije ponovljen je ukupno pet uzastopnih ciklusa kako bi se procenila stabilnost adsorpcionih performansi i dugoročna upotrebljivost materijala.

Dodatno, UV-Vis spektri eluata prikupljenih tokom regeneracionih koraka analizirani su kako bi se procenio stepen desorpcije boje, kao i potencijal za njenu ponovnu upotrebu.

4.2.5. Izračunavanje molekulskih dimenzija

Trodimenzionalne molekulske strukture ispitivanih boja preuzete su iz baze podataka PubChem u obliku Structure Data File (SDF) fajlova. Molekulske strukture obrađene su pomoću namenski izrađenog Python skripta radi procene njihovih molekulskih dimenzija. Ukratko, atomske koordinate su najpre poravnate duž glavnih molekulskih osa primenom analize glavnih komponenti, nakon čega je određen minimalni trodimenzionalni granični kvadar. Molekulske dimenzije izračunate su na osnovu minimalnih i maksimalnih atomskih koordinata duž svake od glavnih osa.

Pored toga, procenjene su i približne van der Waalsove dimenzije proširivanjem molekulskih granica u skladu sa van der Waalšovim poluprečnicima prisutnih atoma. Izračunate dimenzije prikazane su kao dužina $\times$ širina $\times$ debljina (nm) i korišćene su isključivo za kvalitativno poređenje sa karakterističnim širinama pora određenim NLDFT analizom. S obzirom na to da su proračuni izvršeni za izolovane molekulske konformere, dobijene vrednosti ne treba tumačiti kao rigidne kinetičke prečnike molekula u vodenom rastvoru.

4.2.6. Ostala korišćena oprema

Hemikalije su merene korišćenjem analitičke vage (Sartorius 2632) i tehničke vage (Mettler Toledo), dok su zapremine tečnih uzoraka određivane automatskim pipetama (Eppendorf Research). pH vrednost određivana je pomoću pH metra (Consort C830 multi-parameter analyser).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih nanočestica srebra

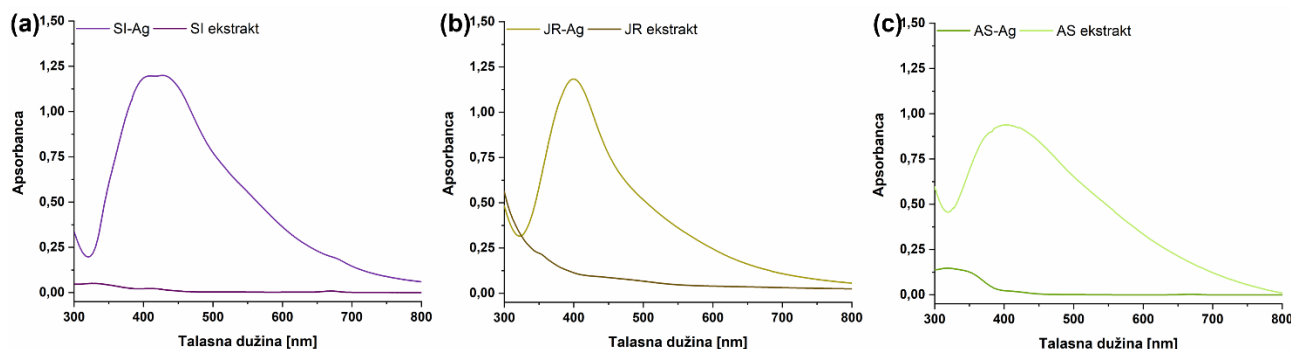
Na Slici 9 prikazani su UV-Vis apsorpcioni spektri sintetisanih AgNPs, kao i odgovarajućih biljnih ekstrakata u koncentracijama ekvivalentnim onima korišćenim tokom procesa sinteze. UV-Vis spektroskopija predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za potvrdu formiranja AgNPs, budući da metalne nanočestice srebra pokazuju karakterističan apsorpcioni maksimum usled fenomena lokalizovane površinske plazmonske rezonance (LSPR).

Iz prikazanih spektara može se uočiti da se u svim ispitivanim sistemima javlja izražen apsorpcioni maksimum u oblasti od 400 do 420 nm, što potvrđuje uspešnu redukciju Ag^+ jona i formiranje AgNPs. Maksimumi LSPR traka registrovani su na približno 415 nm za SI-Ag, 400 nm za JR-Ag i 405 nm za AS-Ag. Ove vrednosti su u skladu sa podacima iz literature za sferične ili približno sferične AgNPs sintetisane zelenim putem, pri čemu se maksimum plazmonske rezonance najčešće nalazi u opsegu od 390 do 450 nm [269].

Razlike u položaju maksimuma između pojedinačnih uzoraka ukazuju na određene razlike u veličini, morfologiji i površinskim karakteristikama sintetisanih nanočestica. Poznato je da pomeranje LSPR maksimuma ka većim talasnim dužinama može biti povezano sa povećanjem veličine nanočestica, promenom njihovog oblika ili promenama u lokalnom dielektričnom okruženju koje nastaju usled adsorpcije različitih biomolekula iz ekstrakata na površinu nanočestica [270].

Poređenjem spektara AgNPs sa spektrima odgovarajućih ekstrakata može se primetiti da ekstrakti ne pokazuju izražene apsorpcione maksimume u oblasti karakterističnoj za plazmonske rezonance srebra. Iako pojedine komponente ekstrakata apsorbuju UV zračenje i doprinose ukupnoj apsorbanci u oblasti manjih talasnih dužina, intenzivni maksimumi prisutni samo kod uzoraka AgNPs potvrđuju da su oni posledica formiranja AgNPs. Ovaj rezultat ukazuje da biomolekuli prisutni u ekstraktima uspešno deluju kao redukciona i stabilizaciona sredstva tokom procesa sinteze.

Takođe, uočava se da su plazmonske trake relativno široke i asimetrične, sa postepenim opadanjem apsorbanse ka većim talasnim dužinama. Takav oblik trake ukazuje na određeni stepen polidisperznosti sistema, odnosno na postojanje raspodele veličina nanočestica u suspenziji. Dodatno proširenje trake može biti posledica međučestičnih interakcija, kao i prisustva organskih molekula iz ekstrakata adsorbovanih na površini AgNPs.

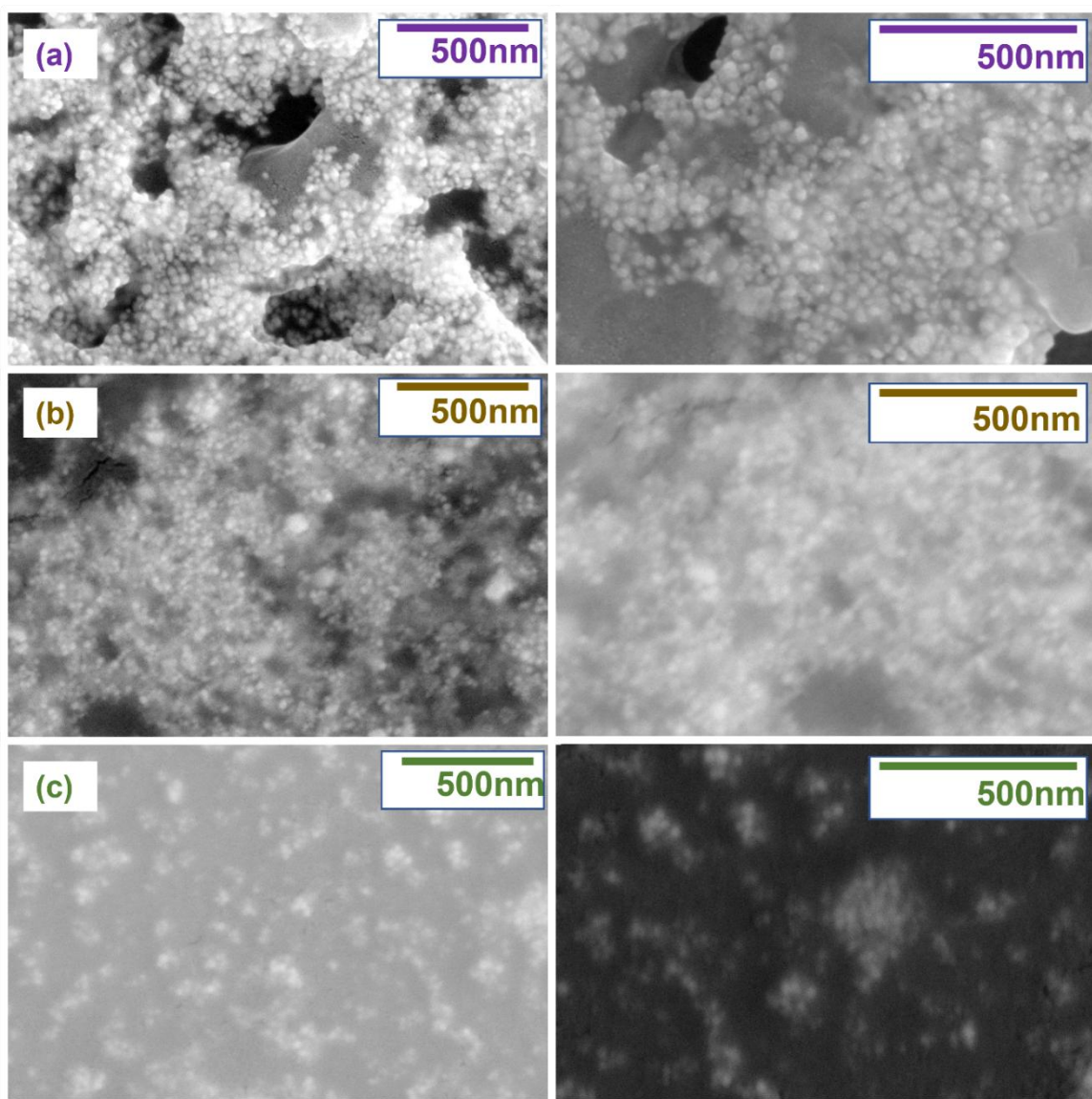


Slika 9. UV-Vis apsorpcioni spektri sintetisanih AgNPs i odgovarajućih biljnih ekstrakata u koncentracijama korišćenim tokom sinteze: (a) SI-Ag i SI ekstrakta, (b) JR-Ag i JR ekstrakta i (c) AS-Ag i AS ekstrakta.

ICP-OES analiza je korišćena za određivanje koncentracije AgNPs koja odgovara apsorbanci 1 na spektrima dobijenim UV-Vis spektroskopijom. Dobijene vrednosti iznose 39,06 ppm za SI-Ag, 30,33 ppm za JR-Ag i 52,95 ppm za AS-Ag.

Linearnost odnosa između apsorbance i koncentracije zasniva se na Ber-Lamberovom zakonu, prema kojem je apsorbanca direktno proporcionalna koncentraciji apsorbujuće vrste u rastvoru u određenom opsegu talasnih dužina i pod uslovom da sistem ne pokazuje značajna odstupanja usled raspršenja ili interakcija između čestica [271]. Na osnovu ove linearne aproksimacije, navedene ICP-OES dobijene koncentracije pri $A = 1$ korišćene su kao referentne tačke za preračunavanje koncentracija AgNPs u svim daljim eksperimentalnim uslovima. Na taj način obezbeđena je konzistentna i uporediva kvantifikacija koncentracija nanočestica u okviru svih ispitivanih sistema i uzoraka.

Morfologija sintetisanih AgNPs ispitana je SEM metodom, pri čemu su uočene značajne razlike u organizaciji i agregaciji čestica između analiziranih uzoraka. SEM mikrografije sintetisanih AgNPs SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag snimljene pri uvećanjima od $100000\times$ i $150000\times$ (Slika 10). Kod sva tri uzorka uočava se formiranje nanočestica koje grade aglomerate različite gustine i morfologije, što potvrđuje uspešnu sintezu.



Slika 10. SEM mikrografije sintetisanih AgNPs: (a) SI-Ag, (b) JR-Ag i (c) AS-Ag, snimljene pri uvećanjima $100000\times$ (levo) i $150000\times$ (desno).

U slučaju uzorka SI-Ag (Slika 11a), jasno su vidljive brojne približno sferične nanočestice relativno uniformnih dimenzija koje formiraju kompaktne aglomerate. Pojedinačne čestice su dobro definisane, dok prisustvo većih aglomerata ukazuje na delimičnu agregaciju tokom procesa sušenja uzorka ili usled međučestičnih interakcija. Uprkos tome, granice između pojedinačnih čestica ostaju jasno uočljive, što ukazuje na visok stepen formiranja nanočestica.

Kod uzorka JR-Ag (Slika 11b) uočava se izraženiji stepen aglomeracije. Pojedinačne nanočestice su teže razikuju zbog formiranja gušće i kompaktnije strukture, pri čemu dolazi do međusobnog povezivanja većeg broja čestica. Ovakva morfologija može ukazivati na efikasnu površinsku stabilizaciju organskim komponentama ekstrakta, ali i na intenzivnije međučestične interakcije koje dovode do stvaranja većih aglomerata.

Za uzorak AS-Ag (Slika 11c) karakteristično je prisustvo diskretnijih nanočestica raspoređenih po površini sa znatno manjim stepenom agregacije u odnosu na prethodna dva uzorka. Pojedinačne čestice su bolje razdvojene i ravnomernije raspoređene, što ukazuje na efikasniju stabilizaciju tokom procesa sinteze. Takva morfologija ukazuje da biomolekuli prisutni u AS ekstraktu mogu imati značajnu ulogu u sprečavanju aglomeracije nanočestica.

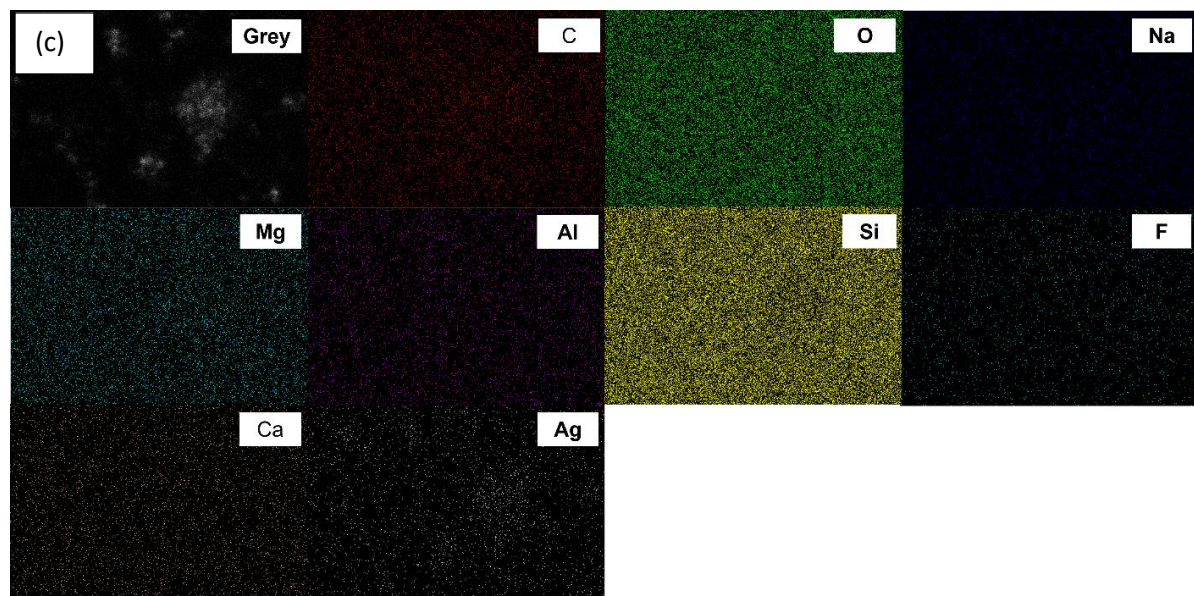
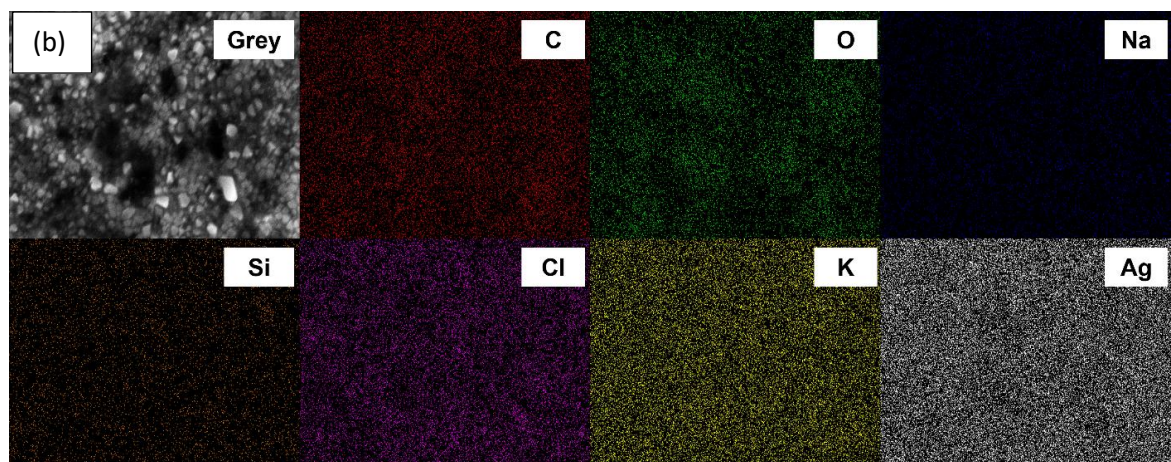
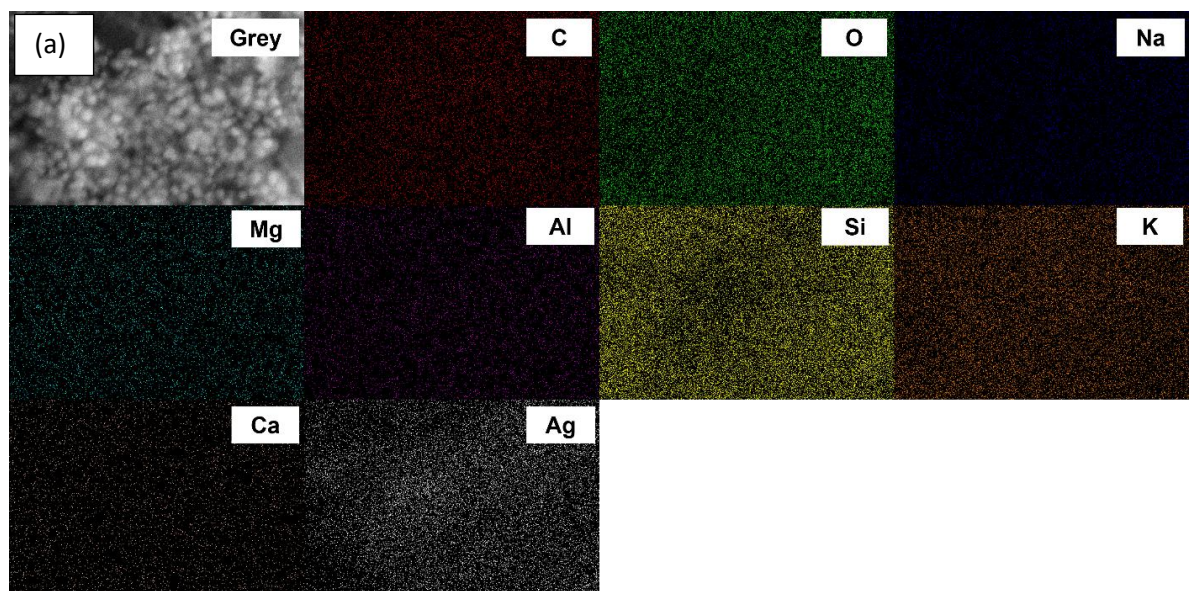
Za sva tri uzorka dominantan oblik čestica je približno sferičan, što je u skladu sa UV-Vis rezultatima, gde su registrovani maksimumi u oblasti oko 400–415 nm. Odsustvo dodatnih plazmonskih traka karakterističnih za anizotropne strukture dodatno potvrđuje pretežno sferičnu morfologiju sintetisanih AgNPs.

Elementarno mapiranje dobijeno EDX analizom potvrđuje prisustvo srebra u svim sintetisanim uzorcima, što ukazuje na uspešnu redukciju Ag^+ jona i formiranje AgNPs primenom biljnih ekstrakata. Signal Ag je uočen kod SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag uzoraka, pri čemu je njegova raspodela relativno ujednačena u analiziranim oblastima. To pokazuje da AgNPs nisu prisutne samo u izolovanim zonama, već su raspoređene po površini ispitivanog materijala.

Pored srebra, na EDX mapama sva tri uzorka jasno se uočavaju ugljenik i kiseonik, što je očekivano s obzirom na organsko poreklo redukujućih i stabilizujućih komponenti iz biljnih ekstrakata. Prisustvo C i O može se povezati sa biomolekulima adsorbovanim na površini nanočestica, koji učestvuju u njihovoj stabilizaciji i mogu uticati na agregaciju, površinsku reaktivnost i interakcije sa biološkim sistemima.

Kod SI-Ag uzorka, osim Ag, C i O, detektovani su Na, Mg, Al, Si, K i Ca, dok su kod JR-Ag uzorka prisutni Na, Si, Cl i K. U Ag-AS uzorku uočeni su Na, Mg, Al, Si, F i Ca. Ovi prateći elementi najverovatnije potiču iz mineralnog sastava korišćenih biljnih ekstrakata ili iz zaostalih neorganskih komponenti nakon sinteze i sušenja uzoraka. Prisustvo K, Na, Mg i Ca može se povezati sa prirodnim sastavom biljnog materijala, dok se Si i Al mogu pripisati mineralnim primesama ili neorganskim komponentama biljnog porekla.

Uporedna analiza elementarnih mapa pokazuje da sva tri uzorka imaju sličan osnovni sastav, sa prisustvom Ag, C i O, dok se razlike u pratećim elementima mogu pripisati specifičnom hemijskom sastavu pojedinačnih biljnih ekstrakata. Dobijeni rezultati potvrđuju da ekstrakti *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum* ne učestvuju samo u redukciji jona srebra, već doprinose i formiranju specifičnog površinskog okruženja AgNPs, što može biti značajno za njihovu stabilnost i biološki odgovor.



Slika 11. Elementarno mapiranje primenom EDX analize: (a) SI-Ag, (b) JR-Ag i (c) AS-Ag nanočestica

Zeta potencijal sintetisanih AgNPs predstavlja ključni parametar za procenu njihove koloidne stabilnosti, budući da odražava stepen površinskog naelektrisanja i intenzitet elektrostatičkih interakcija između nanočestica u disperziji. Dobijene srednje vrednosti iznose -29,97 mV za SI-Ag, -16,5 mV za JR-Ag i -30,7 mV za AS-Ag.

Uočava se da su SI-Ag i AS-Ag uzorci karakterisani izraženim negativnim zeta potencijalom, približno -30 mV, što ukazuje na visoku elektrostatičku stabilnost koloidnog sistema. Takve vrednosti sugerišu da je površina nanočestica u ovim sistemima značajno pokrivena negativno naelektrisanim funkcionalnim grupama i/ili adsorbovanim biomolekulima, što dovodi do jakog međučestičnog odbijanja i smanjene tendencije ka aglomeraciji [272]. Nasuprot tome, JR-Ag uzorak pokazuje znatno nižu apsolutnu vrednost zeta potencijala (-16,5 mV), što ukazuje na slabije izraženo površinsko naelektrisanje i posledično manju elektrostatičku stabilnost sistema. Ova razlika implicira da su međučestične interakcije u ovom sistemu izraženije, što povećava verovatnoću sudara i formiranja aglomerata.

Dobijeni rezultati mogu se direktno povezati sa razlikama u LSPR ponašanju registrovanim UV-Vis spektroskopijom. Uzorci SI-Ag i AS-Ag, koji pokazuju izraženije negativne vrednosti zeta potencijala, istovremeno su i sistemi u kojima su SEM mikrografijama uočene bolje definisane i relativno odvojene nanočestice, uz manji stepen agregacije. Ovo ukazuje da izraženije površinsko negativno naelektrisanje doprinosi većem elektrostatičkom odbijanju između čestica, čime se stabilizuje disperzni sistem i ograničava njihovo međusobno udruživanje. Suprotno tome, JR-Ag uzorak pokazuje znatno nižu apsolutnu vrednost zeta potencijala, što ukazuje na slabiju elektrostatičku stabilizaciju sistema.

DLS analiza sintetisanih AgNPs izvršena je radi određivanja hidrodinamičkog prečnika čestica i procene njihove raspodele veličina u vodenoj disperziji. Na Slici 12 prikazane su raspodele veličina dobijene na osnovu intenziteta rasute svetlosti (Slika 12a) i brojčane raspodele čestica (Slika 12b).

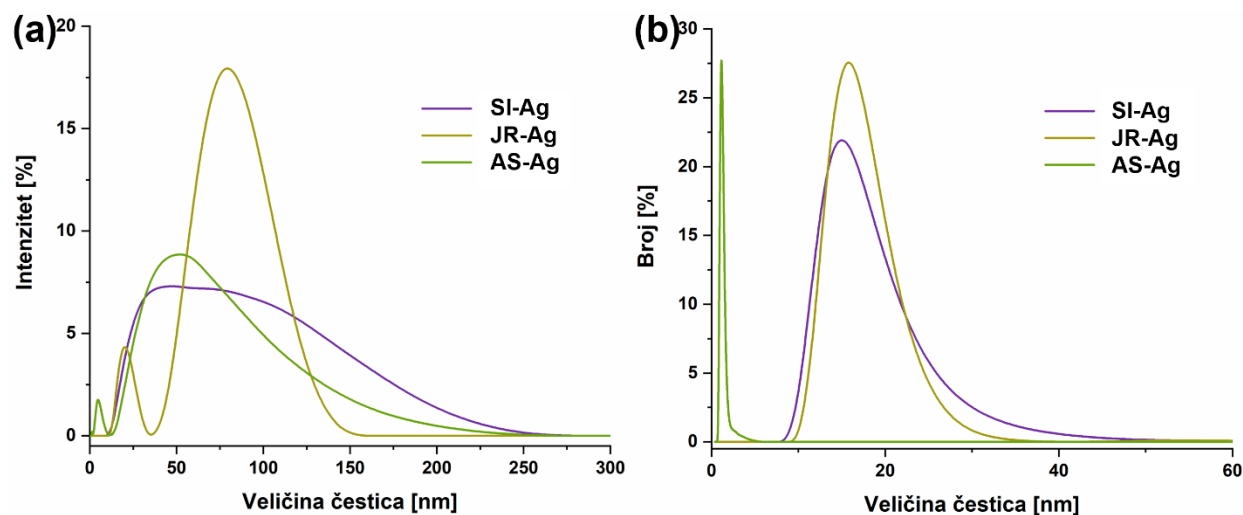
Intenzitetska raspodela (Slika 12a) pokazuje značajne razlike između ispitivanih uzoraka. SI-Ag uzorak karakteriše široka raspodela sa dominantnim maksimumom u oblasti 25-100 nm i izraženim repom ka većim veličinama, koji se proteže do oko 250 nm. Ovakva raspodela ukazuje na prisustvo polidisperznog sistema sastavljenog od pojedinačnih nanočestica i manjih agregata. JR-Ag pokazuje bimodalnu raspodelu (manje intenzivan maksimum na 17 nm i dominantan maksimum na 80 nm). Kod uzorka AS-Ag se takođe uočava bimodalna rasporedla. Prvi, manje intenzivan maksimum se javlja na vrednosti 5 nm, dok se drugi, dominantniji, maksimum javlja na vrednosti od 50 nm, uz postepeno opadanje intenziteta ka većim prečnicima.

Na brojčanoj raspodeli SI-Ag i JR-Ag pokazuju veoma slične maksimume hidrodinamičkog prečnika, približno 18 nm, što ukazuje da najveći broj čestica u ovim sistemima pripada istoj veličinskoj oblasti. Kod AS-Ag uzorka dominantna populacija nalazi se pri znatno manjim veličinama (3 nm), što ukazuje na formiranje veoma sitnih nanočestica. Istovremeno, uska raspodela ukazuje na relativno homogenu populaciju čestica.

Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa prethodno određenim vrednostima zeta potencijala. Naime, AS-Ag poseduje najizraženiji negativni zeta potencijal (-30,7 mV), što ukazuje na efikasnu elektrostatičku stabilizaciju i sprečavanje rasta i agregacije čestica tokom sinteze. Slično tome, SI-Ag pokazuje visoku stabilnost (-29,97 mV), ali i širu raspodelu veličina, što ukazuje na prisustvo manjeg udela agregata. Sa druge strane, JR-Ag poseduje najmanju apsolutnu vrednost zeta potencijala (-16,5 mV), što je u skladu sa SEM analizom koja je pokazala izraženiji stepen aglomeracije. Prisustvo ovih aglomerata posebno je vidljivo u intenzitetskoj raspodeli, gde veće čestice nesrazmerno doprinose ukupnom DLS signalu.

Poređenjem DLS i SEM rezultata može se zaključiti da sva tri uzorka sadrže primarne nanočestice relativno malih dimenzija, dok razlike u hidrodinamičkom prečniku prvenstveno potiču od različitog stepena agregacije i debljine organskog omotača formiranog biomolekulima iz biljnih ekstrakata.

Najstabilniji i najfinije dispergovan sistem predstavlja AS-Ag, dok JR-Ag pokazuje najveću sklonost ka međučestičnom udruživanju.



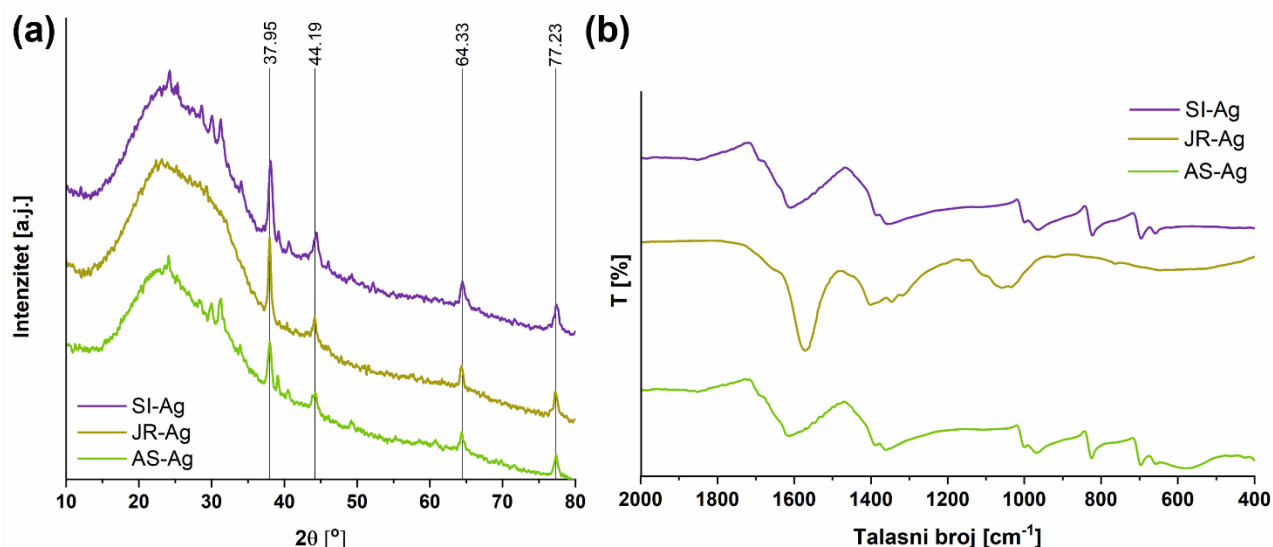
Slika 12. Raspodela hidrodinamičkog prečnika AgNPs dobijena DLS metodom: (a) intenzitetska raspodela, (b) brojčana raspodela

XRD analizom (Slika 13a) potvrđena je kristalna struktura sintetisanih AgNPs. Kod sva tri uzorka registrovani su jasno izraženi difrakcioni maksimumi na 2θ vrednostima od približno $37,95^\circ$, $44,19^\circ$, $64,33^\circ$ i $77,23^\circ$, koji odgovaraju kristalografskim ravnima (111), (200), (220) i (311) karakterističnim za kubnu površinski centriranu strukturu metalnog srebra. Prisustvo istih karakterističnih refleksija kod SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag potvrđuje da je, bez obzira na biljni ekstrakt korišćen tokom zelene sinteze, u sva tri sistema uspešno formirana kristalna faza metalnog srebra [147].

Difrakcioni maksimum koji odgovara ravni (111) predstavlja dominantnu refleksiju kod svih ispitivanih uzoraka, što je karakteristično za AgNPs sa fcc kristalnom strukturom. Relativno oštri maksimumi potvrđuju formiranje kristalnih nanostrukture, dok razlike u njihovoj širini i relativnom intenzitetu mogu biti povezane sa razlikama u veličini kristalita, stepenu kristaliničnosti, distribuciji veličina i načinu organizacije čestica. Istovremeno, u oblasti približno $10-30^\circ$ prisutan je širok difuzioni signal, posebno uočljiv kod pojedinih uzoraka, koji se može pripisati amorfnoj organskoj komponenti poreklom iz biljnih ekstrakata [273].

FTIR analizom (Slika 13b) potvrđeno je prisustvo organskih funkcionalnih grupa na površini sintetisanih AgNPs, koje potiču od biomolekula iz biljnih ekstrakata korišćenih tokom zelene sinteze. U prikazanom spektralnom opsegu od 2000 do 400 cm^{-1} kod sva tri uzorka registrovane su apsorpcione trake u sličnim oblastima, ali sa razlikama u njihovom intenzitetu i obliku. Izražene trake u oblasti približno $1650-1550\text{ cm}^{-1}$ mogu se pripisati prvenstveno istežućim vibracijama C=O i C=C veza u konjugovanim i aromatičnim strukturama, uz mogući doprinos amidnih grupa biomolekula biljnog porekla [274]. Trake u opsegu $1450-1350\text{ cm}^{-1}$ mogu se povezati sa deformacionim vibracijama C-H grupa, kao i vibracijama C-O i C-N veza, dok apsorpcione trake u oblasti $1150-1000\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju istezanju C-O i C-O-C veza karakterističnih za alkohole, fenolna jedinjenja, etre, ugljene hidrate i glikozidne strukture [274]. Signali registrovani u oblasti približno $900-700\text{ cm}^{-1}$ mogu se pripisati vanravanskim deformacionim vibracijama aromatičnih C-H veza, dok se trake pri još nižim talasnim brojevima mogu povezati sa različitim skeletnim vibracijama organskih komponenti vezanih za površinu nanočestica [275].

Prisustvo O-H, C=O, C=C, C-O i C-O-C funkcionalnih grupa podržava pretpostavku da biomolekuli iz biljnih ekstrakata imaju dvostruku ulogu, odnosno da učestvuju u redukciji Ag^+ jona, ali i da se nakon formiranja nanočestica adsorbiraju na njihovu površinu i deluju kao stabilizacioni agensi. Tako formiran organski omotač može ograničiti rast i agregaciju AgNPs i uticati na njihovo površinsko naelektrisanje i koloidnu stabilnost [274]. Razlike u FTIR spektrima SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag stoga ukazuju da, iako sva tri uzorka poseduju isto kristalno jezgro metalnog srebra potvrđeno XRD analizom, hemijski sastav njihovog površinskog biomolekuskog sloja zavisi od biljnog prekursora korišćenog tokom zelene sinteze.



Slika 13. (a) XRD difraktogrami i (b) FTIR spektri sintetisanih AgNPs

5.2. Biohemijski efekti nanočestica srebra

5.2.1. Ispitivanje uticaja na ćelijsku liniju TK6

5.2.1.1. *Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika*

Validnost testa za procenu produkcije ROS (Tabela 1) potvrđena je primenom pozitivne kontrole, odnosno tretmana vodonik-peroksidom. H_2O_2 je doveo do statistički značajnog povećanja ROS u odnosu na kontrolu ($p = 0,000007$), što potvrđuje osetljivost eksperimentalnog sistema i pouzdanost primenjenog testa za detekciju intracelularne produkcije ROS.

Tretman TK6 ćelija AgNPs sintetisanim pomoću različitih biljnih ekstrakata pokazao je da produkcija ROS nije bila uniformna, već je varirala u zavisnosti od tipa AgNPs i njihove primenjene koncentracije.

Za SI-Ag utvrđen je značajan efekat na ćelije $F(8,18)=17,75$; $p<0,001$; $\eta^2 = 0,89$. Na koncentracijama do 10 ppm nije bilo značajnih razlika u odnosu na kontrolni nivo, dok je značajno smanjenje nivoa ROS uočeno pri koncentracijama od 20 ppm do 50 ppm.

Tretman JR-Ag nanočesticama indukovao je značajne efekte $F(8,18)=9,89$; $p<0,001$; $\eta^2=0,81$. Zabeležena je značajno veća produkcija ROS u odnosu na kontrolu pri 20 ppm, dok pri ostalim koncentracijama nema značajnih razlika u odnosu na kontrolu. Ovakav trend pokazuje da JR-Ag, za razliku od SI-Ag, mogu izazvati prolazno povećanje ROS u srednjem koncentracionom opsegu, ali bez izraženog oksidativnog odgovora pri najvišim koncentracijama.

AS-Ag nanočestice su u TK6 ćelijama indukovale koncentraciono zavisno smanjenje produkcije ROS posebno u opsegu 20 ppm do 50 ppm, $F(8,18)=6,60$; $p<0,001$; $\eta^2=0,75$. Najizraženije smanjenje je utvrđeno pri najvišoj primenjenoj koncentraciji od 50 ppm ($69,50\% \pm 5,46\%$).

Sveukupno, rezultati pokazuju da ispitivane AgNPs ne dovode do snažnog povećanja ROS u TK6 ćelijama. Kod tretmana SI-Ag i AS-Ag nanočesticama dolazi do smanjenja nivoa ROS sa porastom koncentracije, dok tretman JR-Ag uzrokuje prolazno povećanje u srednjem koncentracionom opsegu, posebno pri 20 ppm. Međutim, ni kod jednog tretmana vrednosti ROS nisu dostigle nivo pozitivne kontrole, što ukazuje da u ispitivanom koncentracionom opsegu ne dolazi do izražene indukcije oksidativnog stresa. Dobijene promene treba tumačiti zajedno sa rezultatima citotoksičnosti, jer smanjenje ROS-a pri višim koncentracijama može biti povezano sa smanjenom vijabilnošću ili promenjenom metaboličkom aktivnošću tretiranih ćelija.

Tabela 1. Relativni nivo ROS na modelu TK6 ćelija u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag

Kontrola	98,30		
	100,00		
	101,70		
	100,00$\pm$1,70^{abc}		
H₂O₂	136,94		
	138,85		
	136,31		
	137,37$\pm$1,33		
0,01 ppm	SI-Ag	JR-Ag	AS-Ag
	95,97	90,87	83,65
	94,06	82,80	85,35
	81,53	87,69	94,48
	90,52$\pm$7,84^{ac}	87,12$\pm$4,06^a	87,83$\pm$5,82^{ac}
0,1 ppm	91,93	90,23	89,60
	95,33	92,57	82,17
	91,30	86,41	94,27
	92,85$\pm$2,17^a	89,74$\pm$3,11^a	88,68$\pm$6,10^{ac}
	106,16	84,93	83,65
1 ppm	87,69	86,84	79,19
	82,38	95,33	102,97
	92,07$\pm$12,48^a	89,03$\pm$5,54^a	88,61$\pm$12,64^{ac}
	96,18	95,33	90,23
	86,20	123,78	83,65
10 ppm	84,50	99,79	78,34
	88,96$\pm$6,31^{ac}	106,30$\pm$15,30^{abc}	84,08$\pm$5,96^{abc}
20 ppm	71,13	132,91	82,59
	81,32	112,53	75,80
	69,64	128,24	84,50

	74,03±6,36^{bc}	124,56±10,68^c	80,96±4,58^{ab}
	70,91	111,04	69,64
	71,55	117,41	74,95
30 ppm	68,58	108,49	76,43
	70,35±1,56^b	112,31±4,59^{bc}	73,67±3,57^{ab}
	62,85	90,87	81,53
	64,33	98,94	71,55
40 ppm	56,69	97,45	73,89
	61,29±4,05^b	95,75±4,29^{ab}	75,65±5,22^{ab}
	59,45	90,02	66,67
	62,85	83,65	75,80
50 ppm	61,36	89,60	66,03
	61,22±1,70^b	87,76±3,56^a	69,50±5,46^b

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

5.2.1.2. Citokinezis-blok mikronukleus test i analiza citokinezis-blok proliferativnog indeksa

Genotoksični i citostatski potencijal AgNPs ispitan je na humanim TK6 ćelijama primenom citokinezis-blok mikronukleus testa. Ćelije su tretirane različitim koncentracijama SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag, u opsegu od 0,01 ppm do 50 ppm, nakon čega su analizirani učestalost MN i CBPI kao pokazatelji hromozomskih oštećenja i proliferativne aktivnosti ćelija.

MMC, korišćen kao referentni genotoksični agens i pozitivna kontrola u cilju potvrde osetljivosti eksperimentalnog sistema, izazvao je značajno povećanje učestalosti MN u odnosu na netretiranu kontrolu ($p = 0,0001$), uz istovremeno značajno smanjenje CBPI ($p = 0,0002$). Poređenje sa ispitivanim nanočesticama pokazalo je da je MMC izazvao značajno viši nivo indukcije MN u celokupnom opsegu koncentracija, uključujući i najviše ispitivane koncentracije SI-Ag ($p = 0,0004$), JR-Ag ($p = 0,013$) i AS-Ag ($p = 0,0004$), što potvrđuje njegov snažan klastogeni potencijal i intenzivniji genotoksični efekat u odnosu na eksperimentalne tretmane. U pogledu proliferativne aktivnosti, MMC je doveo do značajnog smanjenja CBPI u poređenju sa AgNPs, uključujući najviše koncentracije SI-Ag ($p = 0,004$) i AS-Ag ($p = 0,0008$), što ukazuje na izražen citostatski efekat. Izuzetak je zabeležen kod JR-Ag pri najvišoj ispitanoj koncentraciji (40 ppm), gde nije utvrđena statistički značajna razlika u CBPI u odnosu na MMC ($p = 0,177$), što sugeriše uporediv nivo inhibicije proliferacije ćelija.

Tretman ćelija SI-Ag nanočesticama doveo je do značajnog povećanja učestalosti MN u ispitivanom koncentracionom opsegu ($F(8,18) = 111,04$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,98$), što ukazuje na snažan genotoksični efekat i indukciju hromozomskih oštećenja (Tabela 2). Učestalost MN je pokazala koncentraciono-zavisno porast, pri čemu je najniža učestalost zabeležena u kontrolnoj grupi, a najviše vrednosti su uočene pri koncentraciji od 40 ppm. Pri višim koncentracijama, vrednosti MN bile su značajno veće u poređenju sa kontrolom i nižim koncentracijama. Iako je učestalost MN rasla sa povećanjem koncentracije, pri najvišoj koncentraciji (50 ppm) efekat je bio slabije izražen, što ukazuje na smanjen ćelijski odgovor usled izraženog citostatskog/citotoksičnog efekta i smanjenja proliferacije ćelija.

Analiza CBPI vrednosti pokazala je značajno koncentraciono-zavisno smanjenje proliferativne aktivnosti ćelija nakon tretmana SI-Ag nanočesticama ($F(8,18) = 318,14$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,99$). Najviše srednje vrednosti CBPI zabeležene su u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama do 0,1 ppm, dok je

najizraženije smanjenje utvrđeno pri koncentraciji od 50 ppm. Pri višim koncentracijama, posebno 40 ppm i 50 ppm, zabeleženo je značajno smanjenje proliferativne aktivnosti u odnosu na kontrolu i niže koncentracije ($p < 0,001$), što ukazuje na snažan citostatski efekat SI-Ag.

Rezultati korelacione analize ukazuju na značajnu negativnu korelaciju između učestalosti MN i vrednosti CBPI nakon tretmana SI-Ag nanočesticama ($r = -0,90$; $p < 0,001$), što pokazuje da je porast genotoksičnog efekta praćen izraženim smanjenjem proliferativne aktivnosti ćelija. Ovakav odnos može se objasniti aktivacijom kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, pokušajem popravke DNK oštećenja, kao i selektivnim gubitkom teško oštećenih ćelija, što zajedno dovodi do smanjenja proliferativnog kapaciteta ćelija.

Dodatna korelaciona analiza između učestalosti MN i nivoa ROS u TK6 ćelijama nakon tretmana SI-Ag nanočesticama pokazala je na značajnu negativnu korelaciju ($r = -0,85$; $p < 0,001$). Takav odnos ukazuje da genotoksični efekat SI-Ag nanočestica u TK6 ćelijama ne mora biti direktno posledica povećane akumulacije ROS, već može uključivati i druge mehanizme, kao što su direktna interakcija AgNPs sa DNK ili poremećaj formiranja i funkcije mitotskog vretena, inhibicija proliferacije i selektivni gubitak metabolički aktivnih ćelija [276].

Tabela 2. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim SI-Ag

SI-Ag	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN				% mBN ćelija	MN/ mBN ćeliji	CBPI
		0	1	2	3			
Kontrola	7,02	2122	15	0	0	0,70	1,00	2,26
	6,82	2183	15	0	0	0,68	1,00	2,28
	8,63	2298	20	0	0	0,86	1,00	2,28
	7,49±0,99^a							2,27±0,01^b
0,01 ppm	7,87	2016	16	0	0	0,79	1,00	2,20
	8,73	2043	18	0	0	0,87	1,00	2,19
	7,52	2111	16	0	0	0,75	1,00	2,18
	8,04±0,62^a							2,19±0,01^g
0,1 ppm	8,41	2004	17	0	0	0,84	1,00	2,25
	9,81	2018	20	0	0	0,98	1,00	2,28
	8,82	2134	19	0	0	0,88	1,00	2,26
	9,01±0,72^a							2,26±0,02^b
1 ppm	12,22	2102	26	0	0	1,22	1,00	2,15
	12,18	2108	26	0	0	1,22	1,00	2,13
	13,55	2039	28	0	0	1,35	1,00	2,16
	12,65±0,78^e							2,15±0,02^f
10 ppm	18,52	2014	38	0	0	1,85	1,00	2,08
	19,03	2063	38	1	0	1,86	1,03	2,07
	16,27	2117	33	1	0	1,58	1,03	2,08
	17,94±1,47^b							2,08±0,01^a
20 ppm	19,57	2054	41	0	0	1,96	1,00	2,02
	20,60	2094	40	2	0	1,97	1,05	2,03
	17,13	2123	37	0	0	1,71	1,00	2,00
	19,10±1,78^b							2,02±0,02^e
30 ppm	20,97	2008	43	0	0	2,10	1,00	2,10

	20,80	2025	41	1	0	2,03	1,02	2,11
	19,58	2053	41	0	0	1,96	1,00	2,09
	20,45±0,76^{bc}							2,10±0,01^a
40 ppm	24,32	2007	48	1	0	2,38	1,02	1,97
	23,76	2013	49	0	0	2,38	1,00	1,99
	24,25	2014	46	2	0	2,33	1,04	1,97
	24,11±0,31^d							1,98±0,01^d
50 ppm	23,73	2058	48	1	0	2,33	1,02	1,89
	21,12	2087	43	1	0	2,06	1,02	1,87
	22,65	2114	49	0	0	2,27	1,00	1,90
	22,50±1,31^{cd}							1,89±0,02^c
MMC	71,59	2027	148	4	0	6,98	1,03	1,48
	66,58	2049	142	2	0	6,57	1,01	1,53
	58,64	2104	129	1	0	5,82	1,01	1,66
	65,60±6,53							1,56±0,09

MN/1000 BN ćelija→ učestalost mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; **Distribucija MN**→ distribucija mikronukleusa po ćeliji; **% mBN** ćelija-procenat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; **MN/mBN** ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; **CBPI**→ citokinezis-blok proliferativni indeks; Srednje vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Rezultati analize učestalosti MN dobijeni nakon tretmana ćelija JR-Ag nanočesticama ukazuju na kompleksan biološki odgovor (Tabela 3). Tretman JR-Ag značajno je uticao na učestalost MN u ispitivanom opsegu koncentracija ($F(7,16) = 278,05$, $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,99$). Pri niskim koncentracijama (do 1 ppm) učestalost MN je rasla, potom je zabeležen pad na 10 ppm, i zatim ponovni porast učestalosti pri višim koncentracijama. Paralelno, na koncentracijama JR-Ag do 1 ppm, CBPI je bio sličan ili uvećan u odnosu na kontrolu, dok je pri višim koncentracijama zabeležen izražen koncentraciono-zavisni pad proliferativne aktivnosti. Statistička analiza je potvrdila veoma snažan efekat tretmana na CBPI ($F(7,16) = 666,50$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,99$).

Pri najnižoj koncentraciji (0,001 ppm) uočen je simultani porast učestalosti MN i proliferativne aktivnosti u odnosu na kontrolu, što sugerise rani ćelijski odgovor na stres u kojem dolazi do aktivacije ćelijskog ciklusa uprkos prisustvu DNK oštećenja. Ovaj rezultat može ukazivati na nepotpunu ili vremenski odloženu aktivaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, što omogućava ulazak oštećenih ćelija u mitozu i posledično formiranje MN. Uočeno smanjenje vrednosti MN na 10 ppm može biti posledica selektivnog gubitka teško oštećenih ćelija, kao i smanjenja proliferativno aktivne populacije u kojoj se MN mogu detektovati. Ponovni porast MN pri višim koncentracijama može ukazivati na dodatne mehanizme oštećenja, uključujući pojačan oksidativni stres ili gubitak efikasnosti popravke DNK, što dovodi do ponovne dominacije genotoksičnog efekta u preostalim preživelim ćelijama [277]. Važno je istaći da je najviša testirana koncentracija (50 ppm) dovela do gotovo potpune inhibicije ćelijske proliferacije, što je onemogućilo kvantitativnu procenu učestalosti MN i CBPI.

Dobijeni rezultati CBMN testa pokazuju značajnu negativnu korelaciju između učestalosti MN i CBPI ($r = -0,89$; $p < 0,001$) što ukazuje da je povećanje genotoksičnog opterećenja praćeno smanjenjem proliferativnog kapaciteta ćelija.

Kod JR-Ag nije utvrđena statistički značajna korelacija između učestalosti MN i nivoa ROS ($p > 0,05$) što ukazuje na odsustvo direktne zavisnosti između genotoksičnog odgovora i ukupnog oksidativnog statusa ćelije.

Tabela 3. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim JR-Ag

JR-Ag	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN				% mBN ćelija	MN/ mBN ćeliji	CBPI
		0	1	2	3			
Kontrola	7,02	2122	15	0	0	0,70	1,00	2,26
	6,82	2183	15	0	0	0,68	1,00	2,28
	8,63	2298	20	0	0	0,86	1,00	2,28
	7,49±0,99^d							2,27±0,01^b
0,01 ppm	12,14	2035	25	0	0	1,21	1,00	2,36
	11,34	2093	24	0	0	1,13	1,00	2,35
	11,05	2148	24	0	0	1,10	1,00	2,38
	11,51±0,56^a							2,36±0,02^f
0,1 ppm	16,17	2069	34	0	0	1,62	1,00	2,30
	15,19	2074	32	0	0	1,52	1,00	2,33
	15,61	2081	33	0	0	1,56	1,00	2,29
	15,66±0,49^b							2,31±0,02^b
1 ppm	20,26	2031	42	0	0	2,03	1,00	2,16
	18,81	2086	40	0	0	1,88	1,00	2,19
	20,16	2139	44	0	0	2,02	1,00	2,18
	19,74±0,81^c							2,18±0,02^e
10 ppm	14,71	2010	28	1	0	1,42	1,03	2,08
	13,53	2115	29	0	0	1,35	1,00	2,06
	13,82	2142	28	1	0	1,34	1,03	2,09
	14,02±0,61^{ab}							2,08±0,02^d
20 ppm	23,52	2076	50	0	0	2,35	1,00	1,97
	21,04	2094	45	0	0	2,10	1,00	1,93
	21,86	2103	47	0	0	2,19	1,00	1,94
	22,14±1,26^c							1,95±0,02^c
30 ppm	34,73	2003	68	2	0	3,38	1,03	1,68
	30,55	2031	64	0	0	3,05	1,00	1,66
	32,76	2069	66	2	0	3,18	1,03	1,71
	32,68±2,09^e							1,68±0,03^a
40 ppm	50,78	2024	98	5	0	4,84	1,05	1,64
	45,65	2053	90	4	0	4,38	1,04	1,63
	48,14	2080	97	4	0	4,63	1,04	1,67
	48,19±2,57^f							1,65±0,02^a
50 ppm	/							/
MMC	71,59	2027	148	4	0	6,98	1,03	1,48
	66,58	2049	142	2	0	6,57	1,01	1,53
	58,64	2104	129	1	0	5,82	1,01	1,66
	65,60±6,53							1,56±0,09

MN/1000 BN ćelija→ učestalost mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; **Distribucija MN**→ distribucija mikronukleusa po ćeliji; **% mBN** ćelija-procenat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; **MN/mBN** ćelija-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; **CBPI**→ citokinezis-blok proliferativni indeks; Srednje vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Tretman ćelija AS-Ag nanočesticama (Tabela 4) doveo je do značajnih promena u učestalosti MN ($F(8,18) = 83,97$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,97$) i proliferativnoj aktivnosti ćelija ($F(8,18) = 109,30$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,98$), pri čemu uočeni efekti nisu pokazivali jasnu koncentraciono-zavisnu povezanost. U poređenju sa kontrolom, niže koncentracije (0,01-1 ppm) izazvale su povećanje učestalosti MN, sa izraženim efektom pri 1 ppm, što ukazuje na potencijalnu indukciju hromozomskih oštećenja pri ovim koncentracijama. Nakon toga, pri koncentracijama od 20-40 ppm uočen je pad učestalosti MN, dok je pri 50 ppm ponovo zabeležen porast genotoksičnog odgovora.

Prolazno smanjenje MN pri pojedinim koncentracijama, naročito pri 20 ppm, ukazuje da ćelijski odgovor na AS-Ag uključuje interakciju više paralelnih procesa, uključujući aktivaciju mehanizama popravke DNK, promene proliferativne aktivnosti i selektivno uklanjanje teško oštećenih ćelija. Ovakav višefazni odgovor sugerise da intenzitet genotoksičnog efekta ne zavisi isključivo od koncentracije, već i od sposobnosti ćelije da aktivira zaštitne mehanizme u različitim uslovima izloženosti. Poznato je da bioaktivna jedinjenja belog luka, posebno organosumporna jedinjenja, mogu pokazivati i antioksidativna i prooksidativna svojstva u zavisnosti od koncentracije, trajanja izlaganja i tipa ćelija. Pri višim koncentracijama dolazi do ponovnog porasta učestalosti MN, što može ukazivati na prevazilaženje kapaciteta ćelija za popravku DNK oštećenja i posledičnu akumulaciju hromozomskih oštećenja [277]. Analiza CBPI vrednosti pokazala je smanjenje proliferativne aktivnosti ćelija sa porastom koncentracije, naročito pri 40 ppm i 50 ppm ($p = 0,000173$), što ukazuje na snažan citostatski efekat AS-Ag.

Za razliku od tretmana SI-Ag i JR-Ag, u slučaju AS-Ag nije utvrđena statistički značajna korelacija između učestalosti MN i CBPI ($p > 0,05$), što ukazuje na odsustvo stabilne linearne veze između genotoksičnog i proliferativnog odgovora.

Ovakav rezultat može se tumačiti kao posledica heterogenog ćelijskog odgovora, u kojem su procesi indukcije DNK oštećenja i regulacije ćelijskog ciklusa delimično odvojeni ili pod uticajem različitih mehanizama [277]. Za razliku od MN, koji predstavljaju direktne pokazatelje hromozomskih oštećenja, proliferativni indeks odražava integrisani ćelijski odgovor koji zavisi od kompleksne regulacije kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i različitih signalnih puteva. Ovi mehanizmi mogu biti različito i asinhrono aktivirani unutar ćelijske populacije, što rezultuje heterogenošću proliferativnog odgovora u odnosu na stepen genotoksičnog oštećenja [277].

Kod AS-Ag nije zabeležena statistički značajna korelacija između učestalosti MN i nivoa ROS ($p > 0,05$). Ovaj rezultat ukazuje da povećanje učestalosti MN nije povezano sa povećanjem ROS. S obzirom na višefazni odgovor AS-Ag, ovakav rezultat dodatno podržava pretpostavku da su genotoksični i oksidativni odgovor delimično razdvojeni. Drugim rečima, indukcija mikronukleusa nakon tretmana AS-Ag verovatno nije posledica isključivo ROS-posredovanog oštećenja, već može zavisiti od kombinacije prooksidativnih i antioksidativnih efekata bioaktivnih komponenti, promena u proliferaciji, aktivacije mehanizama popravke DNK i selekcije oštećenih ćelija [277, 278].

Tabela 4. Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim AS-Ag

AS-Ag	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN				% mBN ćelija	MN/ mBN ćeliji	CBPI
		0	1	2	3			
Kontrola	7,02	2122	15	0	0	0,70	1,00	2,26
	6,82	2183	15	0	0	0,68	1,00	2,28
	8,63	2298	20	0	0	0,86	1,00	2,28
	7,49±0,99^c							2,27±0,01^e
0,01 ppm	13,86	2063	29	0	0	1,39	1,00	2,23
	12,24	2098	26	0	0	1,22	1,00	2,24
	12,59	2196	28	0	0	1,26	1,00	2,23
	12,90±0,85^a							2,23±0,01^{ae}
0,1 ppm	13,43	2057	28	0	0	1,34	1,00	2,20
	14,67	2082	31	0	0	1,47	1,00	2,20
	13,36	2142	29	0	0	1,34	1,00	2,21
	13,82±0,74^a							2,20±0,01^a
1 ppm	22,27	2063	47	0	0	2,23	1,00	2,23
	23,08	2074	49	0	0	2,31	1,00	2,24
	21,75	2114	47	0	0	2,17	1,00	2,21
	22,37±0,67^b							2,23±0,02^a
10 ppm	21,63	2037	41	2	0	2,07	1,05	2,1
	19,86	2074	40	1	0	1,94	1,02	2,09
	20,97	2103	41	2	0	2,00	1,05	2,12
	20,82±0,89^b							2,10±0,02^c
20 ppm	9,25	2034	19	0	0	0,93	1,00	2,16
	9,04	2084	17	1	0	0,86	1,06	2,17
	7,42	2141	14	1	0	0,70	1,07	2,14
	8,57±1,00^{cd}							2,16±0,02^d
30 ppm	10,85	2006	22	0	0	1,08	1,00	2,13
	12,30	2009	21	2	0	1,13	1,09	2,12
	11,04	2061	21	1	0	1,06	1,05	2,12
	11,40±0,79^{ad}							2,12±0,01^{cd}
40 ppm	12,96	2056	27	0	0	1,30	1,00	2,00
	15,28	2062	32	0	0	1,53	1,00	2,04
	14,78	2067	31	0	0	1,48	1,00	2,03
	14,34±1,22^a							2,02±0,02^b
50 ppm	23,87	2004	49	0	0	2,39	1,00	2,05
	20,16	2138	44	0	0	2,02	1,00	2,08
	21,56	2178	48	0	0	2,16	1,00	2,04
	21,86±1,87^b							2,06±0,02^b
MMC	71,59	2027	148	4	0	6,98	1,03	1,48
	66,58	2049	142	2	0	6,57	1,01	1,53
	58,64	2104	129	1	0	5,82	1,01	1,66
	65,60±6,53							1,56±0,09

MN/1000 BN ćelija→ učestalost mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija; **Distribucija MN**→ distribucija mikronukleusa po ćeliji; **% mBN** ćelija-procenat binukleusnih ćelija sa mikronukleusima; **MN/mBN ćelija**-broj mikronukleusa po binukleusnoj ćeliji sa mikronukleusima; **CBPI**→ citokinezis-blok proliferativni indeks; Srednje vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Najizraženija razlika uočena je kod SI-Ag, gde značajna negativna korelacija ukazuje na to da je porast MN povezan sa smanjenjem ROS, verovatno usled izraženog citostatskog efekta i smanjene metaboličke aktivnosti ćelija pri višim koncentracijama. Kod JR-Ag i AS-Ag odsustvo korelacija potvrđuje heterogen i složen odgovor. Ovi rezultati ukazuju da su MN kod tretiranih TK6 ćelija verovatno posledica kombinovanog delovanja oksidativnih i neoksidativnih mehanizama.

Komparativna analiza efekata SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag na humanim TK6 ćelijama pokazala je da sve ispitivane AgNPs indukuju genotoksične i citostatske efekte, ali sa značajnim razlikama u intenzitetu, dinamici i organizaciji ćelijskog odgovora, što se može povezati sa razlikama u bioaktivnom sastavu biljnih ekstrakata korišćenih tokom procesa zelene sinteze. Poznato je da ekstrakti biljaka korišćenih za sintezu AgNPs sadrže različite klase biološki aktivnih jedinjenja koja mogu uticati na stabilnost nanočestica, njihov redoks potencijal, interakciju sa ćelijskim strukturama i aktivaciju signalnih puteva uključenih u odgovor na stres. Ekstrakt *Saintpaulia ionantha* bogat je fenolnim jedinjenjima i flavonoidima sa izraženim antioksidativnim svojstvima, što može doprineti stabilnijem i konzistentnijem biološkom odgovoru na tretman SI-Ag. Nasuprot tome, ekstrakt *Juglans regia* sadrži polifenole, tanine i naftokinonska jedinjenja poznata po izraženoj redoks aktivnosti, što može doprineti dinamičnom ćelijskom odgovoru na JR-Ag. Ekstrakt *Allium sativum* karakteriše prisustvo reaktivnih organosumpornih jedinjenja, koja mogu ispoljavati i antioksidativna i prooksidativna svojstva u zavisnosti od koncentracije i uslova izlaganja, što potencijalno doprinosi heterogenom i višefaznom obrascu odgovora na tretman AS-Ag.

Iako su sve AgNPs dovele do povećanja učestalosti MN i smanjenja proliferativne aktivnosti ćelija, uočene razlike u biološkom odgovoru ukazuju na postojanje različitih mehanizama delovanja, kao i razlika u funkcionalnoj povezanosti između indukcije DNK oštećenja i aktivacije mehanizama regulacije ćelijskog ciklusa. SI-Ag indukuju stabilan i konzistentan koncentraciono-zavisnan genotoksično-citostatski odgovor, sa jasnom funkcionalnom povezanošću između indukcije DNK oštećenja i supresije proliferativne aktivnosti ćelija. JR-Ag indukuju dinamičan ćelijski odgovor, koji se karakteriše promenama u odnosu između genotoksičnog opterećenja i proliferativnog kapaciteta ćelija pri različitim nivoima izloženosti, što ukazuje na kompleksnu i vremenski zavisnu regulaciju ćelijskog odgovora na stres. Nasuprot tome, AS-Ag izazivaju heterogen ćelijski odgovor u kojem su procesi indukcije DNK oštećenja i regulacije proliferacije funkcionalno disocirani i varijabilno aktivirani unutar ćelijske populacije.

5.2.1.3. Ispitivanje citotoksičnosti primenom ABCAM testa

Ćelijska vijabilnost TK6 ćelija nakon tretmana SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag nanočesticama ispitana je primenom ab112118 testa, pri čemu je MMC korišćen kao pozitivna kontrola. Validnost testa potvrđena je značajnim smanjenjem vijabilnosti nakon tretmana MMC u odnosu na kontrolu, i to za sva tri seta eksperimenata: SI-Ag ($p = 0,000011$), JR-Ag ($p = 0,000055$) i AS-Ag ($p = 0,000108$) (Tabela 5). Vrednosti vijabilnosti nakon tretmana MMC bile su izrazito niske i iznosile su $5,71 \pm 2,71\%$, $7,00 \pm 1,77\%$ i $7,87 \pm 1,01\%$, što potvrđuje osetljivost eksperimentalnog sistema za detekciju smanjenja metaboličke aktivnosti/vijabilnosti TK6 ćelija.

Tretman SI-Ag doveo je do značajnog koncentraciono zavisnog smanjenja vijabilnosti TK6 ćelija, $F(8,18)=90,54$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,98$. Značajan pad vijabilnosti uočen je od 10 ppm, gde je vrednost iznosila $59,29 \pm 8,09\%$, dok je pri 20 ppm dodatno smanjena na $50,64 \pm 16,08\%$. Najizraženiji

citotoksični efekat zabeležen je pri koncentracijama od 30, 40 i 50 ppm, sa vrednostima od $13,68 \pm 7,98\%$, $7,92 \pm 3,23\%$ i $2,49 \pm 0,28\%$. Ovi rezultati ukazuju da SI-Ag nanočestice pri višim koncentracijama izazivaju snažan citotoksični efekat, koji je po intenzitetu pri 40 i 50 ppm uporediv sa efektom pozitivne kontrole.

Kod JR-Ag je zabeležen najizraženiji i najbrži pad vijabilnosti među ispitivanim AgNPs $F(8,18)=210,20$; $p<0,001$; $\eta^2 = 0,99$. *Post hoc* analiza ukazuje da pri koncentracijama do 0,1 ppm JR-Ag nanočestice ne izazivaju izražen gubitak vijabilnosti ćelija, što sugerise da ćelije u ovom opsegu izloženosti uspevaju da očuvaju metaboličku i proliferativnu stabilnost. Pri većim koncentracijama uočen je trend smanjenja vijabilnosti i izraženiji citotoksični odgovor, što ukazuje na postepeno narušavanje ćelijske homeostaze i ograničenje kapaciteta ćelija da kompenzuju stres izazvan tretmanom. Nagli pad je uočen pri 10 ppm, gde je vijabilnost smanjena na $8,94 \pm 8,43\%$, sa dodatnim smanjenjem pri koncentracijama od 20 do 50 ppm. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodno opisanim CBMN podacima, gde je najviša koncentracija JR-Ag dovela do gotovo potpune inhibicije proliferacije, zbog čega nije bilo moguće kvantitativno proceniti učestalost MN.

Statistička analiza je potvrdila značajan efekat tretmana sa AS-Ag nanočesticama, $F(8,18) = 24,27$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,91$. Najizraženije smanjenje vijabilnosti zabeleženo je pri 50 ppm ($49,38 \pm 7,36\%$). Iako AS-Ag značajno utiče na vijabilnost TK6 ćelija, intenzitet citotoksičnog efekta je znatno blaži u poređenju sa SI-Ag i JR-Ag, jer je i pri najvišoj koncentraciji očuvano gotovo 50 % vijabilnosti.

U poređenju sa SI-Ag i AS-Ag, JR-Ag nanočestice pokazuju najizraženiji citotoksični potencijal prema TK6 ćelijama, jer već pri 10 ppm dovode do gotovo potpune inhibicije vijabilnosti.

Korelaciona analiza između vijabilnosti i nivoa ROS dodatno ukazuje na različite obrasce ćelijskog odgovora u zavisnosti od tipa nanočestica. Kod SI-Ag utvrđena je značajna pozitivna korelacija između vijabilnosti TK6 ćelija i ROS nivoa ($r = 0,89$; $p < 0,001$). Ovaj rezultat pokazuje da je smanjenje vijabilnosti bilo praćeno smanjenjem ROS nivoa, što je u skladu sa prethodno opisanim smanjenjem nivoa ROS pri višim koncentracijama SI-Ag. Drugim rečima, niži nivoi ROS pri visokim koncentracijama posledica su izraženog citotoksičnog dejstva.

Kod JR-Ag utvrđena je značajna negativna korelacija između vijabilnosti i nivoa ROS ($r = -0,63$; $p < 0,001$). Zbog toga se može zaključiti da je kod JR-Ag citotoksični efekat jasno povezan sa ukupnim nivoom detektovanog ROS, odnosno sa povećanjem nivoa ROS smanjuje se vijabilnost ćelija.

Kod AS-Ag zabeležena je značajna pozitivna korelacija između vijabilnosti i ROS nivoa ($r = 0,66$; $p < 0,001$). Kako se pri višim koncentracijama AS-Ag smanjuju i vijabilnost i nivo ROS, može se pretpostaviti da smanjena metabolička aktivnost ćelija doprinosi nižem detektovanom nivou ROS. Međutim, za razliku od SI-Ag, kod AS-Ag je pad vijabilnosti bio znatno blaži, pa se ovaj odnos može tumačiti kao posledica postepenog smanjenja ćelijske aktivnosti, a ne akutnog i gotovo potpunog citotoksičnog efekta.

Rezultati pokazuju da se citotoksični potencijal ispitivanih nanočestica prema TK6 ćelijama smanjuje redosledom JR-Ag > SI-Ag > AS-Ag. JR-Ag je pokazao najizraženiji efekat, sa gotovo potpunim smanjenjem vijabilnosti već pri 10 ppm, dok SI-Ag izaziva postepeniji, ali veoma snažan pad vijabilnosti pri višim koncentracijama. AS-Ag je pokazao najblaži efekat, jer je i pri najvišoj koncentraciji očuvano približno polovina metaboličke aktivnosti ćelija. Povezanost vijabilnosti sa oksidativnim stresom pokazuje da smanjenje ROS pri višim koncentracijama, naročito kod SI-Ag i AS-Ag, ne treba interpretirati kao antioksidativni efekat nanočestica, već kao posledicu smanjenog broja metabolički aktivnih ćelija. Ovi nalazi dodatno potvrđuju da se ROS rezultati moraju razmatrati zajedno sa pokazateljima vijabilnosti, proliferacije i genotoksičnosti.

Tabela 5. Procenat ćelijske vijabilnosti TK6 ćelija (ab112118) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag

Ab112118	SI-Ag	JR-Ag	AS-Ag
Kontrola	106,24	110,02	105,72
	96,94	93,98	94,92
	96,82	96,00	99,36
	100±5,40^a	100,00±8,74^d	100,00±5,42^{de}
0,01 ppm	104,80	97,36	107,65
	99,60	95,36	113,06
	91,98	92,59	98,37
	98,79±6,45^a	95,10±2,40^{cd}	106,36±7,43^e
0,1 ppm	89,54	89,43	104,42
	89,52	87,44	103,40
	89,29	74,49	96,96
	89,45±0,14^a	83,79±8,11^{bc}	101,59±4,05^{de}
1 ppm	84,89	82,42	96,08
	82,30	72,72	82,28
	82,82	71,06	81,73
	83,34±1,37^a	75,40±6,13^b	86,70±8,13^{bd}
10 ppm	67,71	0,50	62,53
	58,60	8,97	74,14
	51,57	17,36	67,13
	59,29±8,09^c	8,94±8,43^a	67,93±5,85^{abc}
20 ppm	64,39	3,59	77,43
	32,95	4,13	75,91
	54,59	3,73	81,17
	50,64±16,08^c	3,82±0,28^a	78,17±2,70^{ab}
30 ppm	21,27	4,15	69,32
	14,40	3,26	70,60
	5,37	2,80	72,81
	13,68±7,98^b	3,40±0,69^a	70,91±1,76^{ab}
40 ppm	7,15	4,05	59,53
	5,14	3,38	53,11
	11,47	3,04	77,39
	7,92±3,23^b	3,49±0,52^a	63,35±12,58^{ac}
50 ppm	2,73	4,11	57,35
	2,56	3,40	47,97
	2,19	2,95	42,84
	2,49±0,28^b	3,49±0,59^a	49,38±7,36^c
MMC	8,84	8,80	8,31
	4,19	5,27	8,59
	4,11	6,93	6,72
	5,71±2,71	7,00±1,77	7,87±1,01

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

5.2.1.4. Indukcija apoptoze

Apoptotski odgovor TK6 ćelija nakon tretmana SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag praćen je određivanjem procenta ćelija u apoptozi (Tabela 6). Validnost testa potvrđena je primenom MMC kao pozitivne kontrole, koji je doveo do izraženog i statistički značajnog povećanja procenta apoptotskih ćelija u odnosu na kontrolu ($p = 0,000001$). U kontrolnim uzorcima procenat apoptotskih ćelija iznosio je $7,39 \pm 1,23\%$, dok je nakon tretmana MMC dostigao $50,17 \pm 0,92\%$, čime je potvrđena osetljivost eksperimentalnog sistema za detekciju indukcije apoptoze.

Tretman SI-Ag doveo je do jasnog koncentraciono-zavisnog povećanja procenta apoptotskih TK6 ćelija, $F(8,18) = 356,08$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,99$. Već pri najnižoj koncentraciji od 0,01 ppm zabeleženo je povećanje apoptoze na $12,84 \pm 0,59\%$, dalji porast koncentracije doveo je do znatno izraženijeg apoptotskog odgovora. Pri najvišim koncentracijama (40 i 50ppm), procenat apoptotskih ćelija iznosio je $48,22 \pm 1,28\%$ i $53,91 \pm 3,18\%$, čime je dostignut, pa čak i premašen, nivo apoptoze zabeležen nakon tretmana MMC. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu utvrđene su kroz ceo ispitivani koncentracioni opseg, što ukazuje da SI-Ag indukuje apoptotski odgovor već pri veoma niskim koncentracijama, sa progresivnim pojačanjem efekta pri višim koncentracijama.

Kod JR-Ag takođe je zabeležen snažan porast procenta apoptotskih ćelija sa povećanjem koncentracije, $F(8,18) = 911,64$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,99$. Pri najnižoj koncentraciji od 0,01 ppm vrednost apoptoze bila je $6,68 \pm 0,88\%$, odnosno približna kontrolnoj vrednosti. Međutim, već pri 0,1 ppm dolazi do povećanja na $15,78 \pm 0,58\%$. Izraženiji procenat ćelija u apoptozi uočen je pri višim koncentracijama, na 50 ppm procenat apoptotskih ćelija iznosio je $50,32 \pm 0,83\%$, što je na nivou pozitivne kontrole.

AS-Ag je pokazao drugačiji obrazac u odnosu na SI-Ag i JR-Ag. Pri koncentraciji od 0,01 ppm procenat apoptotskih ćelija iznosio je $6,93 \pm 0,83\%$, što je bilo približno kontrolnoj vrednosti. Pri 0,1 i 1 ppm došlo je do povećanja apoptoze na $17,56 \pm 0,64\%$ i $20,16 \pm 0,46\%$, dok su pri koncentracijama od 10 do 50 ppm vrednosti ostale u relativno uskom opsegu od $22,52 \pm 0,98\%$ do $24,63 \pm 1,35\%$. Za razliku od SI-Ag i JR-Ag, kod kojih je sa porastom koncentracije zabeležen kontinuiran porast procenta ćelija u apoptozi do vrednosti bliskih MMC tretmanu, kod AS-Ag je nakon početnog povećanja dostignut plato. Statistička analiza potvrdila je značajan efekat AS-Ag na procenat apoptotskih ćelija, $F(8,18) = 162,17$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,99$.

Korelaciona analiza između apoptoze i nivoa ROS pokazala je različitu povezanost ova dva parametra u zavisnosti od tipa AgNPs. Kod SI-Ag je utvrđena značajna negativna korelacija između procenta apoptotskih ćelija i ROS ($r = -0,92$; $p < 0,01$). Ovaj rezultat ukazuje da porast apoptoze nije bio praćen povećanjem ROS, već smanjenjem ROS. Takav nalaz je u skladu sa prethodno opisanim rezultatima vijabilnosti i ROS testa, gde su pri višim koncentracijama SI-Ag istovremeno zabeleženi snažan pad vijabilnosti, povećanje apoptoze i smanjenje ROS. Zbog toga se smanjenje ROS pri višim koncentracijama se može tumačiti kao posledica gubitka metabolički aktivnih ćelija i prelaska ćelijske populacije u apoptotski status.

Kod JR-Ag nije utvrđena korelacija između apoptoze i ROS ($p > 0,05$), što ukazuje da porast apoptoze nije direktno povezan sa ukupnim nivoom detektovanog ROS. Ovaj nalaz je posebno važan jer JR-Ag izaziva vrlo snažan pad vijabilnosti i visok procenat apoptotskih ćelija pri višim koncentracijama, dok ROS odgovor ostaje promenljiv i ne prati jednostavan koncentraciono-zavisni obrazac. To sugerise da kod JR-Ag, pored oksidativnog stresa, značajnu ulogu mogu imati i drugi mehanizmi ćelijskog oštećenja, uključujući poremećaj proliferacije, direktnu interakciju AgNPs sa ćelijskim strukturama i aktivaciju apoptotskih puteva nezavisnih od izraženog porasta ROS.

Kod AS-Ag utvrđena je značajna negativna korelacija između apoptoze i ROS nivoa ($r = -0,63$; $p < 0,001$). Ovaj rezultat pokazuje da je povećanje procenta apoptotskih ćelija bilo povezano sa smanjenjem ROS nivoa. S obzirom na to da AS-Ag izaziva blaži pad vijabilnosti u odnosu na SI-Ag i

JR-Ag, ali ipak dovodi do povećanja apoptoze iznad kontrolnog nivoa, ovaj odnos može ukazivati na postepeno smanjenje metaboličke aktivnosti i promenu funkcionalnog stanja ćelija, a ne na masivnu ROS-posredovanu oksidativnu stimulaciju. Drugim rečima, kod AS-Ag apoptotski odgovor može biti delimično odvojen od povećane produkcije ROS.

Dobijeni rezultati pokazuju da sve tri vrste AgNPs indukuju apoptozu u TK6 ćelijama, ali sa različitim intenzitetom i koncentracionim obrascem. SI-Ag nanočestice pokazuju najjasniji koncentraciono-zavisan porast apoptoze, sa vrednostima pri 40 i 50 ppm koje su uporedive sa pozitivnom kontrolom. JR-Ag takođe indukuje snažan apoptotski odgovor, naročito od 20 ppm naviše, pri čemu pri 50 ppm dostiže nivo sličan MMC. AS-Ag izaziva statistički značajno povećanje apoptoze, ali dostiže plato pri srednjim koncentracijama i ne dovodi do tako intenzivnog apoptotskog odgovora kao SI-Ag i JR-Ag. Povezivanje ovih rezultata sa podacima o vijabilnosti i ROS pokazuje da smanjenje ROS pri višim koncentracijama, posebno kod SI-Ag i AS-Ag, prati povećanje apoptoze i smanjenje vijabilnosti, što ukazuje da ROS u ovim uslovima odražava stanje preostale metabolički aktivne populacije, a ne isključivo stepen oksidativnog stresa.

Tabela 6. Procenat TK6 ćelija u apoptozi u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag

Kontrola		7,73	
		6,03	
		8,42	
		7,39±1,23^{bac}	
MMC		49,32	
		51,15	
		50,04	
		50,17±0,92	
0,01 ppm	SI-Ag	JR-Ag	AS-Ag
	13,47	7,55	7,59
	12,30	5,80	6,00
	12,76	6,70	7,21
	12,84±0,59^c	6,68±0,88^a	6,93±0,83^c
0,1 ppm	18,24	16,35	18,17
	16,80	15,20	16,90
	17,53	15,80	17,62
	17,52±0,72^a	15,78±0,58^b	17,56±0,64^d
1 ppm	18,54	18,44	20,61
	17,10	17,20	19,70
	17,89	17,85	20,18
	17,84±0,72^a	17,83±0,62^b	20,16±0,46^{bd}
10 ppm	28,60	26,13	25,66
	26,50	23,40	23,10
	27,18	24,70	25,12
	27,43±1,07^d	24,74±1,37^c	24,63±1,35^a
20 ppm	40,53	36,81	23,23
	37,00	34,70	21,80
	38,42	35,60	22,88
	38,65±1,78^e	35,70±1,06^d	22,64±0,75^{ab}
30 ppm	45,50	44,47	25,29
	42,30	42,60	23,40
	43,41	43,50	24,76
	43,74±1,62^f	43,52±0,94^e	24,48±0,97^a
40 ppm	49,56	47,62	23,25
	47,00	45,70	21,40
	48,11	46,60	22,91
	48,22±1,28^g	46,64±0,96^f	22,52±0,98^{ab}
50 ppm	57,31	51,16	23,99
	51,00	49,50	22,10
	53,41	50,30	23,54
	53,91±3,18^h	50,32±0,83^g	23,21±0,92^a

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

5.2.2. Ispitivanje uticaja na adherentne ćelije

5.2.2.1. *Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika*

U cilju procene prooksidativnog/antioksidativnog potencijala nanočestica, određivan je relativni nivo intracelularnih reaktivnih vrsta kiseonika u MRC-5, HeLa i A549 ćelijskim linijama. Rezultati su tumačeni u odnosu na netretiranu kontrolu, uzimajući u obzir tip ćelijske linije i primenjenu koncentraciju nanočestica.

Validnost testa za procenu produkcije ROS potvrđena je primenom pozitivne kontrole, odnosno tretmana vodonik-peroksidom. U svim ispitivanim ćelijskim linijama H_2O_2 je doveo do izrazitog povećanja relativnog nivoa ROS u odnosu na netretirane kontrolne uzorke, Statistička analiza je pokazala da je porast ROS u pozitivnoj kontroli bio značajan u odnosu na kontrolu kod sve tri ćelijske linije ($p < 0,05$), što potvrđuje adekvatnu osetljivost eksperimentalnog sistema i pouzdanost primenjenog testa za detekciju oksidativnog odgovora.

Pri tretmanu SI-Ag nanočesticama nije uočeno uniformno povećanje produkcije ROS, već različiti odgovori u zavisnosti od tipa ćelijske linije i primenjene koncentracije (Tabela 7). Tretman SI-Ag nanočesticama dovodi do značajnih promena u nivou ROS kod MRC5 ćelijske linije, $F(8,18) = 25,76$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,92$. Niže koncentracije SI-Ag nisu izazvale izražen porast ROS u odnosu na kontrolu. Povećanje ROS nivoa uočeno je pri koncentracijama od 1 i 10 ppm, što ukazuje na pojavu oksidativnog stresa pri srednjim koncentracijama. Međutim, pri višim koncentracijama, naročito od 30 do 50 ppm, dolazi do smanjenja relativnog nivoa ROS, sa vrednostima od $62,31 \pm 5,78\%$, $56,67 \pm 9,63\%$ i $49,90 \pm 8,48\%$. Ovakav trend ukazuje da odgovor MRC-5 ćelijske linije nije jednostavno koncentraciono-zavisan, već da pri višim koncentracijama smanjenje ROS nivoa može biti povezano sa smanjenjem metaboličke aktivnosti i/ili manjim brojem vijabilnih ćelija.

Tretman SI-Ag nanočesticama značajno je uticao na HeLa ćelije $F(8,18) = 3,89$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,63$, ali nisu utvrđene razlike između tretmana i netretirane kontrole. Odgovor ćelija je bio manje izražen i bez jasnog koncentraciono-zavisnog obrasca. Vrednosti ROS su se pri većini koncentracija kretale oko kontrolnog nivoa ili ispod njega, Blago smanjenje ROS nivoa zabeleženo je pri 10, 30 i 40 ppm, dok je pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, 50 ppm, došlo do blagog povećanja ROS na $113,60 \pm 13,66\%$. Na osnovu toga se može zaključiti da SI-Ag nanočestice u ispitivanom opsegu koncentracija ne izaziva oksidativni stres u HeLa ćelijama.

Najizraženiji trend smanjenja ROS nivoa uočen je kod A549 ćelija, $F(8,18) = 26,62$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,92$. Nakon tretmana SI-Ag suspenzijom, relativni nivo ROS se smanjivao sa porastom koncentracije, naročito u opsegu od 1 do 50 ppm. Ovakav obrazac pokazuje da kod A549 ćelija tretman SI-Ag ne dovodi do povećane akumulacije ROS, već do smanjenja pri višim koncentracijama. Međutim, ovakav rezultat ne mora nužno ukazivati na antioksidativni efekat nanočestica. Smanjen ROS može biti posledica smanjene vijabilnosti, promenjene metaboličke aktivnosti ili manjeg broja funkcionalno aktivnih ćelija nakon tretmana.

Tabela 7. Relativni nivo ROS na modelu MRC-5, HeLa i A549 ćelija u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim SI-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	91,15	102,30	91,76
	111,67	97,80	114,66
	97,18	99,90	93,58
	100,00±10,55^{bc}	100,00±2,25^{ab}	100,00±12,73^f
0,01 ppm	84,91	90,60	75,59
	70,62	105,90	84,31
	75,25	81,60	81,41
	76,93±7,29^{ab}	92,70±12,29^{ab}	80,44±4,44^{de}
0,1 ppm	94,77	101,70	106,66
	91,75	75,00	97,40
	98,19	99,90	94,12
	94,90±3,22^b	92,20±14,92^{ab}	99,39±6,50^{ef}
1 ppm	145,88	107,70	74,86
	115,29	85,20	74,50
	123,54	81,60	73,05
	128,24±15,82^{cd}	91,50±14,14^{ab}	74,14±0,96^{cd}
10 ppm	143,26	72,00	65,41
	129,18	95,40	66,51
	121,33	86,40	64,87
	131,25±11,11^d	84,60±11,80^{ab}	65,60±0,83^{bcd}
20 ppm	94,57	113,40	64,14
	110,06	92,70	57,78
	84,51	110,10	55,97
	96,38±12,87^b	105,40±11,12^a	59,30±4,29^{abc}
30 ppm	63,18	88,80	45,25
	67,61	80,40	52,88
	56,14	87,60	58,69
	62,31±5,78^a	85,60±4,54^{ab}	52,27±6,74^{ab}
40 ppm	59,76	79,50	56,87
	64,39	68,40	51,06
	45,88	59,40	65,41
	56,67±9,63^a	69,10±10,07^b	57,78±7,22^{abc}
50 ppm	59,56	126,90	48,33
	43,66	99,60	47,79
	46,48	114,30	34,34
	49,90±8,48^a	113,60±13,66^a	43,49±7,93^a
H₂O₂	397,99	544,50	225,86
	392,15	562,20	204,06
	409,05	565,80	212,96
	399,73±8,58	557,50±11,40	214,29±10,96

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Statistička analiza potvrđuje da JR-Ag nanočestice značajno utiču na nivo ROS u sve tri ćelijske linije (Tabela 8), ali se obrazac efekta razlikuje od onog dobijenog za SI-Ag. Kod MRC-5 utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih grupa, $F(8,18) = 4,49$; $p < 0,01$, uz vrednost $\eta^2 = 0,665917$. U odnosu na SI-Ag, gde je efekat bio izraženiji, JR-Ag pokazuje slabiji, ali i dalje značajan uticaj na ROS. Statistički značajne promene u odnosu na kontrolu zabeležene su pri koncentracijama od 0,01 i 20 ppm ($p < 0,05$).

U odnosu na prethodno opisani SI-Ag, tretman JR-Ag nanočesticama pokazao je blaži i manje izražen efekat na produkciju ROS u MRC-5 ćelijskoj liniji. Dok je kod SI-Ag pri srednjim koncentracijama, naročito pri 1 i 10 ppm, uočeno povećanje ROS iznad kontrolnog nivoa, JR-Ag nanočestice su u istom koncentracionom opsegu uglavnom održavale ROS ispod kontrole ili približno kontrolnim vrednostima. Najizraženije smanjenje ROS nakon tretmana JR-Ag zabeleženo je pri 0,01 ppm i 20 ppm, gde su vrednosti iznosile $74,25 \pm 1,01\%$ i $75,99 \pm 5,24\%$. Pri najvišoj koncentraciji od 50 ppm, ROS nivo je bio blizak kontrolnom nivou.

Kod HeLa ćelija tretman JR-Ag nanočesticama doveo je do statistički značajnog efekta, $F(8,18) = 6,36$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,74$. Ovaj efekat je izraženiji nego kod SI-Ag, iako biološki trend i dalje ne pokazuje jasno koncentraciono-zavisno povećanje ROS.

Kod HeLa ćelijske linije razlike između SI-Ag i JR-Ag bile su manje izražene. U oba slučaja nije uočen jasan koncentraciono-zavisni porast ROS, a vrednosti su se pri većini koncentracija kretale oko kontrolnog nivoa ili ispod njega.

Kod A549 ćelija tretman JR-Ag nanočesticama bio je statistički veoma značajan, $F(8,18) = 14,42$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,87$. Za razliku od SI-Ag, kod koga je najizraženiji efekat bio povezan sa smanjenjem ROS pri višim koncentracijama. JR-Ag je pokazao dvofazan odgovor: statistički značajno smanjenje ROS pri 20 ppm ($p < 0,05$) i statistički značajno povećanje iznad kontrolnog nivoa pri 30 ppm ($p < 0,05$).

Najveća razlika između tretmana sa SI-Ag i JR-Ag uočena je kod A549 ćelijske linije. Kod SI-Ag je dominirao trend smanjenja ROS sa porastom koncentracije, pri čemu je najniža vrednost zabeležena pri 50 ppm. Nasuprot tome, JR-Ag je pri nižim koncentracijama takođe smanjivao ROS, ali je pri 30 i 40 ppm doveo do povećanja ROS iznad kontrolnog nivoa.

Statistička analiza potvrdila je značajan efekat AS-Ag na produkciju ROS u sve tri ćelijske linije.

U poređenju sa SI-Ag i JR-Ag, tretman AS-Ag nanočesticama pokazao je izraženije koncentraciono zavisne promene ROS nivoa, ali sa različitim obrascem odgovora u zavisnosti od ćelijske linije (Tabela 9). Kod MRC-5 ćelijske linije, tretman AS-Ag nanočesticama je izazvao značajne efekte $F(8,18) = 25,76$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,92$. Pri višim koncentracijama, od 20 do 50 ppm, uočeno je statistički značajno smanjenje ($p < 0,001$) nivoa ROS, sa najnižom vrednošću od $54,93 \pm 5,24\%$ pri 50 ppm. Ovakav obrazac je sličniji odgovoru dobijenom za SI-Ag nego za JR-Ag, budući da se kod MRC-5 pri višim koncentracijama oba tipa AgNPs zapaža smanjenje ROS. Međutim, za razliku od SI-Ag, kod AS-Ag nije uočeno povećanje ROS pri srednjim koncentracijama od 1 i 10 ppm, što ukazuje da AS-Ag u ovoj ćelijskoj liniji ne stimuliše oksidativni odgovor u istoj meri kao SI-Ag.

Tabela 8. Relativni nivo ROS na modelu MRC-5, HeLa i A549 ćelija u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim JR-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	91,15	102,30	91,76
	111,67	97,80	114,66
	97,18	99,90	93,58
	100,00±10,55^c	100,00±2,25^{ab}	100,00±12,73^{bcd}
0,01 ppm	74,25	69,90	79,59
	73,24	75,60	83,22
	75,25	80,70	75,41
	74,25±1,01^a	75,40±5,40^a	79,41±3,91^{ab}
0,1 ppm	74,85	73,80	72,14
	84,51	83,10	93,76
	93,16	66,30	77,41
	84,17±9,16^{abc}	74,40±8,42^a	81,10±11,28^{ab}
1 ppm	97,79	69,00	78,13
	104,63	88,20	90,67
	83,70	60,30	93,03
	95,37±10,67^{abc}	72,50±14,28^a	87,28±8,01^{abc}
10 ppm	79,88	77,70	72,86
	71,83	84,00	93,03
	81,49	71,70	89,22
	77,73±5,17^{abc}	77,80±6,15^a	85,04±10,71^{abc}
20 ppm	70,62	115,50	74,68
	81,09	101,70	66,69
	76,26	104,10	67,05
	75,99±5,24^{ab}	107,10±7,37^b	69,47±4,51^a
30 ppm	79,07	93,30	119,75
	85,51	94,20	133,74
	83,90	109,80	128,65
	82,83±3,35^{abc}	99,10±9,28^{ab}	127,38±7,08^e
40 ppm	74,45	93,60	117,20
	92,15	102,60	126,83
	75,25	75,30	124,47
	80,62±10,00^{abc}	90,50±13,91^{ab}	122,83±5,02^{de}
50 ppm	93,16	117,30	100,48
	91,55	90,60	125,74
	111,27	111,60	102,85
	98,66±10,95^{bc}	106,50±14,06^b	109,69±13,95^{cde}
H₂O₂	397,99	544,50	225,86
	392,15	562,20	204,06
	409,05	565,80	212,96
	399,73±8,58	557,50±11,40	214,29±10,96

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Kod HeLa ćelija utvrđen je statistički značajan efekat tretmana AS-Ag, $F(8,18) = 18,10$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,89$. Statistički značajne promene u odnosu na kontrolu zabeležene su pri koncentracijama od 0,01, 0,1 i 50 ppm ($p < 0,05$). Vrednosti ROS pri 0,01 i 0,1 ppm iznosile su $138,90 \pm 18,12\%$ i $156,60 \pm 14,27\%$, što je znatno više u odnosu na odgovarajuće vrednosti dobijene nakon tretmana sa SI-Ag i JR-Ag. Pri koncentracijama od 1 do 20 ppm vrednosti su se kretale oko kontrolnog nivoa, dok je pri 30, 40 i naročito 50 ppm došlo do smanjenja ROS. Najniža vrednost zabeležena je pri 50 ppm i iznosila je $59,00 \pm 8,49\%$. Ovakav dvofazni odgovor ukazuje da HeLa ćelije pokazuju veću osetljivost na AS-Ag pri niskim koncentracijama, dok se pri najvišoj koncentraciji nivo ROS značajno smanjuje. U odnosu na SI-Ag i JR-Ag, AS-Ag je u HeLa ćelijama pokazao najizraženiji efekat na nivo ROS.

Kod A549 ćelija takođe je potvrđen statistički značajan efekat tretmana AS-Ag, $F(8,18) = 14,09$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,86$. Statistički značajne promene u odnosu na kontrolu zabeležene su pri koncentracijama od 0,01 i 0,1 ppm ($p < 0,01$), što odgovara najizraženijem povećanju ROS nivoa u ovoj ćelijskoj liniji. Za razliku od JR-Ag, kod koga su značajne promene bile vezane za 20 i 30 ppm, AS-Ag je pokazao najjači efekat pri najnižim koncentracijama. Kod A549 ćelijske linije AS-Ag je, slično kao kod HeLa ćelija, pri najnižim koncentracijama doveo do povećanja ROS. Vrednosti pri 0,01 i 0,1 ppm iznosile su $150,58 \pm 10,11\%$ i $146,27 \pm 7,46\%$, što predstavlja najizraženije povećanje ROS među svim ispitivanim AgNPs u ovoj ćelijskoj liniji. Pri 1 i 10 ppm vrednosti su bile blago povišene ili približne kontrolnim vrednostima, dok je pri koncentracijama od 20 do 50 ppm zabeležen pad ROS nivoa, sa najnižom vrednošću od $84,74 \pm 11,28\%$ pri 50 ppm. Za razliku od SI-Ag, kod koga je kod A549 ćelija dominiralo smanjenje ROS sa porastom koncentracije, i JR-Ag, kod koga je porast ROS bio najizraženiji pri 30 i 40 ppm, AS-Ag je najveću produkciju ROS izazvao upravo pri najnižim koncentracijama.

Tabela 9. Relativni nivo ROS na modelu MRC-5, HeLa i A549 ćelija u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim AS-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	91,15	102,30	91,76
	111,67	97,80	114,66
	97,18	99,90	93,58
	100,00±10,55^c	100,00±2,25^a	100,00±12,73^a
0,01 ppm	73,24	158,10	142,46
	67,61	136,50	147,37
	70,62	122,10	161,90
	70,49±2,82^{ab}	138,90±18,12^{cd}	150,58±10,11^b
0,1 ppm	77,67	170,40	141,01
	73,04	157,50	154,82
	79,48	141,90	143,00
	76,73±3,32^b	156,60±14,27^d	146,27±7,46^b
1 ppm	95,77	77,40	122,65
	93,96	103,50	109,21
	108,65	105,90	96,12
	99,46±8,01^c	95,60±15,81^a	109,33±13,27^a
10 ppm	99,60	114,30	118,29
	101,21	99,00	95,03
	103,22	128,10	107,57
	101,34±1,81^c	113,80±14,56^{ac}	106,97±11,64^a
20 ppm	57,75	114,60	80,31
	59,56	99,30	101,94
	58,35	86,40	107,39
	58,55±0,92^{ab}	100,10±14,12^a	96,55±14,32^a
30 ppm	59,36	81,60	95,58
	67,00	88,80	91,94
	56,94	90,30	96,31
	61,10±5,25^{ab}	86,90±4,65^{ab}	94,61±2,34^a
40 ppm	66,80	85,80	103,94
	53,52	76,50	86,67
	75,65	79,20	91,94
	65,33±11,14^{ab}	80,50±4,78^{ab}	94,19±8,85^a
50 ppm	52,31	51,30	96,31
	51,51	57,60	73,77
	60,97	68,10	84,13
	54,93±5,24^a	59,00±8,49^b	84,74±11,28^a
H₂O₂	397,99	544,50	225,86
	392,15	562,20	204,06
	409,05	565,80	212,96
	399,73±8,58	557,50±11,40	214,29±10,96

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

5.2.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti primenom ABCAM testa

Ćelijska vijabilnost MRC-5, HeLa i A549 ćelija nakon tretmana SI-Ag nanočesticama ispitana je primenom ab112118 testa, dok je MMC korišćen kao pozitivna kontrola (Tabela 10). Validnost testa potvrđena je značajnim smanjenjem vijabilnosti nakon tretmana MMC u odnosu na kontrolu kod sve tri ćelijske linije: MRC-5 ($p < 0,05$), HeLa ($p < 0,001$) i A549 ($p < 0,001$). Ovi rezultati potvrđuju osetljivost eksperimentalnog sistema za detekciju smanjenja metaboličke aktivnosti/vijabilnosti ćelija.

Statistička analiza je potvrdila značajan efekat tretmana SI-Ag na MRC-5, $F(8, 18) = 58,96$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,96$. Svi tretmani su pokazali statistički značajno smanjenje vijabilnosti.

Tretman SI-Ag doveo je do izraženog smanjenja vijabilnosti MRC-5 ćelija već pri najnižim ispitivanim koncentracijama. Pri 0,01, 0,1 i 1 ppm vijabilnost je iznosila $45,09 \pm 4,28\%$, $43,38 \pm 3,48\%$ i $47,63 \pm 3,50\%$, što ukazuje da MRC-5 ćelije pokazuju visoku osetljivost na SI-Ag u ovom koncentracionom opsegu. Pri 10 ppm zabeležen je prolazni porast vijabilnosti, dok je pri višim koncentracijama ponovo došlo do izraženog smanjenja, što ukazuje da se pri najvišim koncentracijama jasno ispoljava snažan citotoksični efekat SI-Ag.

Statistička analiza je pokazala značajne razlike između grupa nakon tretmana HeLa ćelija SI-Ag nanočesticama, $F(8, 18) = 54,82$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,96$. Utvrđene su statistički značajne razlike u opsegu od 1 pp-50 ppm, u odnosu na netretiranu kontrolu. Na koncentracijama do 1 ppm zabeležen je porast vijabilnosti, nakon čega vijabilnost opada koncentraciono-zavisno.

Statistička analiza je potvrdila značajan efekat SI-Ag na vijabilnost A549 ćelija, $F(8, 18) = 38,26$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,94$. Pri nižim koncentracijama (0,01 do 1 ppm) vijabilnost ćelija je bila bliska kontrolnoj vrednosti. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti u odnosu na kontrolu zabeleženo je pri koncentracijama od 10 do 50 ppm, što ukazuje da su A549 ćelije manje osetljive na niske koncentracije SI-Ag, dok pokazuju jasan citotoksični odgovor pri višem koncentracionom opterećenju.

Korelaciona analiza između vijabilnosti i ROS pokazala je da je povezanost ova dva parametra zavisila od tipa ćelijske linije. Kod MRC-5 ćelija utvrđena je značajna pozitivna korelacija između vijabilnosti i nivoa ROS nakon tretmana SI-Ag ($r = 0,67$; $p < 0,001$). Ovaj rezultat ukazuje da je smanjen nivo ROS posledica smanjenja broja metabolički aktivnih ćelija.

Kod HeLa ćelija nije utvrđena korelacija između vijabilnosti i ROS nivoa ($p > 0,05$). Ovi rezultati su u skladu sa prethodno opisanim ROS rezultatima, gde SI-Ag nije izazvao jasan koncentraciono-zavisni oksidativni odgovor u HeLa ćelijama, iako su promene u vijabilnosti bile izraženije pri višim koncentracijama.

Kod A549 ćelija utvrđena je značajna pozitivna korelacija između vijabilnosti i ROS nivoa ($r = 0,82$; $p < 0,001$). Kako su pri višim koncentracijama istovremeno zabeleženi smanjenje vijabilnosti i smanjenje nivoa ROS, može se pretpostaviti da pad ROS odražava smanjenu metaboličku aktivnost i manji broj funkcionalno aktivnih ćelija.

Tabela 10. Procenat ćelijske vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija (ab112118) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim SI-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	96,43	104,29	105,15
	104,75	97,33	102,05
	98,81	98,38	92,80
	100,00±4,28^f	100,00±3,75^{ab}	100,00±6,43^a
0,01 ppm	45,62	99,78	102,28
	49,07	108,51	97,55
	40,56	91,33	96,85
	45,09±4,28^{ab}	99,88±8,59^{ab}	98,85±3,00^a
0,1 ppm	47,20	103,18	107,68
	42,59	120,57	109,51
	40,37	118,44	90,77
	43,38±3,48^{ab}	114,06±9,48^{bg}	102,65±10,33^a
1 ppm	51,32	140,33	109,51
	47,22	117,95	99,88
	44,36	125,74	102,78
	47,63±3,50^{ab}	128,01±11,36^g	104,06±4,94^a
10 ppm	78,69	79,94	85,64
	66,88	84,49	76,52
	66,59	85,70	81,89
	70,72±6,90^e	83,38±3,04^{af}	81,35±4,58^b
20 ppm	52,13	81,96	83,22
	46,78	77,45	73,32
	54,31	82,27	73,68
	51,07±3,87^b	80,56±2,70^{ef}	76,74±5,62^b
30 ppm	43,99	67,03	74,77
	22,81	58,55	65,44
	24,79	67,93	64,82
	30,53±11,70^{ad}	64,51±5,17^{de}	68,34±5,57^{bd}
40 ppm	26,62	58,00	64,38
	14,76	59,72	61,09
	13,72	60,06	49,71
	18,36±7,17^{cd}	59,26±1,11^{cd}	58,40±7,70^{cd}
50 ppm	15,93	46,53	44,91
	9,72	44,24	45,55
	7,45	47,37	40,15
	11,03±4,39^c	46,05±1,62^c	43,54±2,95^c
MMC	73,10	53,57	29,08
	80,83	55,89	32,57
	74,80	43,62	31,57
	76,24±4,06	51,03±6,52	31,07±1,80

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Tretman JR-Ag nanočesticama (Tabela 11) takođe je doveo do smanjenja vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija, ali se obrazac odgovora razlikovao u odnosu na prethodno opisani SI-Ag. Validnost testa potvrđena je značajnim smanjenjem vijabilnosti nakon tretmana MMC u odnosu na kontrolu kod sve tri ćelijske linije: MRC-5 ($p < 0,01$), HeLa ($p < 0,001$) i A549 ($p < 0,001$), čime je potvrđena osetljivost eksperimentalnog sistema za detekciju citotoksičnog odgovora.

Statistička analiza je potvrdila značajan efekat JR-Ag na vijabilnost MRC-5 ćelija, $F(8,18) = 29,19$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,93$. Smanjena vijabilnosti utvrđena je u gotovo celom ispitivanom koncentracionom opsegu. Za razliku od SI-Ag, koji je već pri najnižim koncentracijama izazvao izražen pad vijabilnosti na približno 45%, JR-Ag je pri koncentracijama od 0,01 do 40 ppm pokazao blaži efekat. Najizraženije smanjenje vijabilnosti zabeleženo je pri 50 ppm. Statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolu zabeleženo je za sve koncentracije osim 1 i 10 ppm. Ovi rezultati ukazuju da je MRC-5 ćelijska linija osetljiva na JR-Ag, ali da je citotoksični efekat ovih nanočestica pri nižim i srednjim koncentracijama manje izražen nego kod SI-Ag.

Kod HeLa ćelija JR-Ag je izazvao postepenije i koncentraciono jasnije smanjenje vijabilnosti, $F(8, 18) = 82,79$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,97$. Značajno sniženje ćelijske vijabilnosti utvrđeno je u opsegu od 10 ppm- 50 ppm ($p < 0,001$). U odnosu na SI-Ag, kod koga je pri niskim koncentracijama zabeležen porast vijabilnosti HeLa ćelija, JR-Ag nije pokazao takav stimulativni efekat, već je odgovor bio usmeren ka postepenom smanjenju vijabilnosti sa porastom koncentracije.

Kod A549 ćelija JR-Ag je pokazao izraženiji citotoksični efekat nego u MRC-5 i HeLa ćelijama. Statistička analiza je potvrdila veoma izražen efekat tretmana, $F(8,18) = 38,54$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,94$, pri čemu su sve ispitivane koncentracije pokazale statistički značajno smanjenje vijabilnosti u odnosu na kontrolu. Već pri najnižoj koncentraciji od 0,01 ppm vijabilnost je smanjena na $78,37 \pm 7,82\%$. Dalji porast koncentracije doveo je do progresivnog smanjenja vijabilnosti. Za razliku od SI-Ag, kod koga su A549 ćelije bile relativno otporne pri niskim koncentracijama, JR-Ag je već u najnižem koncentracionom opsegu doveo do smanjenja vijabilnosti. Ovi rezultati ukazuju da su A549 ćelije posebno osetljive na JR-Ag, naročito u poređenju sa odgovorom na SI-Ag pri nižim koncentracijama.

Kod MRC-5 ćelija nisu utvrđene značajne korelacije između vijabilnosti i nivoa ROS. Kod HeLa ćelija zabeležena je značajna negativna korelacija između vijabilnosti i ROS nivoa ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Ovaj rezultat ukazuje da je smanjenje vijabilnosti bilo delimično povezano sa povećanjem ROS nivoa, odnosno da oksidativni stres može imati određeni doprinos citotoksičnom odgovoru HeLa ćelija nakon tretmana JR-Ag.

Kod A549 ćelija utvrđena je značajna negativna korelacija između vijabilnosti i ROS nivoa ($r = -0,41$; $p < 0,05$). Ovaj rezultat je posebno značajan jer je kod A549 ćelija JR-Ag izazvao statistički značajno smanjenje vijabilnosti kroz ceo ispitivani koncentracioni opseg, dok su prethodno ROS rezultati pokazali povećanje nivoa pri pojedinim srednje visokim koncentracijama. Zbog toga se može pretpostaviti da kod A549 ćelija oksidativni stres delimično doprinosi citotoksičnom efektu JR-Ag, mada nije jedini mehanizam uključen u smanjenje ćelijske vijabilnosti.

Tabela 11. Procenat ćelijske vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija (ab112118) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim JR-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	96,43	104,29	105,15
	104,75	97,33	102,05
	98,81	98,38	92,80
	100,00±4,28^b	100,00±3,75^a	100,00±6,43^e
0,01 ppm	81,43	96,68	71,46
	87,60	83,43	86,86
	84,16	92,76	76,78
	84,40±3,09^a	90,96±6,81^a	78,37±7,82^d
0,1 ppm	90,79	98,68	65,55
	82,53	96,86	66,21
	82,41	92,58	72,67
	85,25±4,80^a	96,04±3,13^a	68,14±3,94^{cd}
1 ppm	91,88	103,74	74,37
	81,39	101,65	72,23
	91,32	86,40	83,98
	88,20±5,90^{ab}	97,26±9,47^a	76,86±6,26^d
10 ppm	93,94	75,92	60,66
	88,79	70,13	66,51
	97,54	70,50	54,41
	93,42±4,40^{ab}	72,18±3,24^c	60,53±6,05^{bc}
20 ppm	85,36	71,00	58,81
	91,07	70,31	64,84
	77,30	68,05	57,64
	84,57±6,91^a	69,78±1,54^{de}	60,43±3,87^{bc}
30 ppm	80,81	55,90	55,67
	78,86	57,06	49,14
	84,76	58,03	44,79
	81,47±3,01^a	57,00±1,07^{cd}	49,87±5,48^{ab}
40 ppm	82,57	49,44	43,84
	75,13	42,65	46,82
	88,14	43,77	42,91
	81,95±6,52^a	45,29±3,64^{bc}	44,52±2,04^a
50 ppm	49,15	35,92	36,03
	43,20	31,15	42,82
	42,20	29,30	38,53
	44,85±3,76^c	32,12±3,41^b	39,13±3,43^a
MMC	73,10	53,57	29,08
	80,83	55,89	32,57
	74,80	43,62	31,57
	76,24±4,06	51,03±6,52	31,07±1,80

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Tretman AS-Ag nanočesticama (Tabela 12) uticao je na vijabilnost MRC-5, HeLa i A549 ćelija, ali je obrazac odgovora bio drugačiji u odnosu na SI-Ag i JR-Ag. Validnost testa potvrđena je značajnim smanjenjem vijabilnosti nakon tretmana MMC u odnosu na kontrolu kod sve tri ćelijske linije: MRC-5 ($p = 0,002$), HeLa ($p = 0,0003$) i A549 ($p = 0,00006$), što potvrđuje pouzdanost testa za procenu citotoksičnog odgovora.

Kod MRC-5 ćelija, pri najnižim koncentracijama AS-Ag od 0,01, 0,1 i 1 ppm, vijabilnost je bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu. Međutim, za razliku od SI-Ag i JR-Ag, kod kojih je sa porastom koncentracije uglavnom dolazilo do daljeg smanjenja vijabilnosti, tretman AS-Ag je pri koncentracijama od 10 do 40 ppm doveo do povećanja vijabilnosti iznad kontrolnog nivoa. Pri najvišoj koncentraciji od 50 ppm vijabilnost se smanjila na $82,50 \pm 1,45\%$, ali je i dalje ostala znatno viša nego nakon tretmana SI-Ag i JR-Ag pri istoj koncentraciji. Statistička analiza je potvrdila značajan efekat tretmana, $F(8,18) = 82,35$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,97$. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu zabeležene su za sve koncentracije osim 40 i 50 ppm. Ovaj nalaz ukazuje da AS-Ag kod MRC-5 ćelija ne izaziva jednostavan koncentraciono-zavisani citotoksični odgovor, već bifazni obrazac, sa smanjenjem vijabilnosti pri niskim koncentracijama i stimulacijom metaboličke aktivnosti pri srednjim koncentracijama.

Kod HeLa ćelija statistička analiza je potvrdila značajan efekat tretmana sa AS-Ag, $H(8, 18) = 9,66$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,81$. Koncentraciono zavisno smanjenje vijabilnosti u odnosu na kontrolu utvrđeno je u opsegu od 10 ppm - 50 ppm. U poređenju sa JR-Ag, koji je pri 50 ppm smanjio vijabilnost HeLa ćelija na $32,12 \pm 3,41\%$, AS-Ag je pokazao blaži citotoksični efekat na ovoj ćelijskoj liniji.

Kod A549 ćelija, statistička analiza je potvrdila značajan efekat AS-Ag na njihovu vijabilnost, $F(8,18) = 14,869$; $p = 0,000002$; $\eta^2 = 0,868567$. Pri 0,01 ppm vijabilnost je smanjena na $59,56 \pm 4,26\%$, dok je pri 0,1 i 1 ppm bila bez značaja u odnosu na kontrolnu vrednost. Ovaj rezultat ukazuje da, za razliku od JR-Ag, kod koga je smanjenje vijabilnosti bilo prisutno kroz ceo koncentracioni opseg, AS-Ag ne pokazuje linearan odgovor pri nižim koncentracijama. Statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolu zabeleženo je pri koncentracijama iznad 10 ppm, a najizraženije smanjenje vijabilnosti zabeleženo je pri 50 ppm, gde je iznosilo $51,90 \pm 9,78\%$.

Korelaciona analizom nisu utvrđene korelacije između vijabilnosti i nivoa ROS u ispitivanim ćelijskim linijama, što sugerise da citotoksični efekti u ovim ćelijskim linijama verovatno uključuju i mehanizme koji nisu direktno zavisni od ukupnog nivoa detektovanih ROS.

Tabela 12. Procenat ćelijske vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija (ab112118) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim AS-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	96,43	104,29	105,15
	104,75	97,33	102,05
	98,81	98,38	92,80
	100,00±4,28^b	100,00±3,75^a	100,00±6,43^e
0,01 ppm	49,89	71,36	64,47
	40,87	76,22	57,31
	49,84	88,45	56,91
	46,87±5,20^b	78,68±8,81^{bcd}	59,56±4,26^{ac}
0,1 ppm	46,94	64,97	88,47
	62,75	70,77	84,94
	51,71	92,83	73,02
	53,80±8,11^b	76,19±14,70^{abc}	82,15±8,10^{bd}
1 ppm	46,77	71,11	97,62
	50,20	72,30	102,67
	42,47	98,25	101,38
	46,48±3,87^b	80,55±15,53^{cd}	100,56±2,62^d
10 ppm	112,94	69,11	60,23
	125,39	74,04	76,83
	134,46	65,61	67,08
	124,26±10,81^a	69,59±4,24^{abc}	68,05±8,34^{abc}
20 ppm	117,72	64,35	88,07
	130,08	63,61	77,38
	135,65	64,54	73,10
	127,82±9,17^a	64,17±0,49^{abc}	79,51±7,71^{abd}
30 ppm	117,77	64,68	67,05
	132,85	57,63	73,20
	121,50	52,08	86,46
	124,04±7,86^a	58,13±6,32^{abc}	75,57±9,92^{ab}
40 ppm	114,65	56,73	61,96
	115,18	56,73	61,89
	118,63	54,01	74,60
	116,15±2,16^{ad}	55,82±1,57^{ab}	66,15±7,32^{abc}
50 ppm	82,48	52,73	43,59
	81,06	56,33	49,43
	83,96	54,24	62,68
	82,50±1,45^c	54,43±1,81^a	51,90±9,78^c
MMC	73,10	53,57	29,08
	80,83	55,89	32,57
	74,80	43,62	31,57
	76,24±4,06	51,03±6,52	31,07±1,80

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Generalno, AS-Ag pokazuje ćelijski specifičan i manje koncentraciono zavisen citotoksični profil u odnosu na SI-Ag i JR-Ag. Povezivanje sa ROS rezultatima pokazuje da se citotoksični odgovor ne može jednostavno objasniti oksidativnim stresom, već verovatno uključuje kombinaciju promena metaboličke aktivnosti, ćelijski specifičnih adaptivnih odgovora i drugih mehanizama ćelijskog oštećenja.

5.2.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti primenom sulforodamin B testa

Ćelijska vijabilnost MRC-5, HeLa i A549 ćelija nakon tretmana SI-Ag dodatno je ispitana primenom SRB testa (Tabela 13), koji omogućava procenu ukupnog proteinskog sadržaja adherentnih ćelija i time odražava promene u ćelijskoj masi/proliferaciji nakon tretmana. Validnost testa potvrđena je primenom pozitivne kontrole, pri čemu je MMC doveo do statistički značajnog smanjenja vijabilnosti u odnosu na kontrolu kod sve tri ćelijske linije: MRC-5 ($p = 0,003$), HeLa ($p = 0,02$) i A549 ($p = 0,01$).

Kod MRC-5 ćelija, SRB test je pokazao izraženo smanjenje vijabilnosti nakon tretmana SI-Ag, naročito pri koncentracijama od 10 ppm i višim. Pri najnižim koncentracijama, od 0,01 do 1 ppm, vrednosti vijabilnosti su bile približne kontrolnoj vrednosti, međutim, već pri 10 ppm došlo je do naglog pada vijabilnost, nakon čega su vrednosti ostale na sličnom nivou do najviše ispitivane koncentracije.

Statistička analiza potvrdila je značajan efekat SI-Ag na vijabilnost MRC-5 ćelija određenu SRB testom, $F(8,18) = 138,89$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,94$. U poređenju sa prethodno prikazanim testom vijabilnosti, gde je smanjenje metaboličke aktivnosti bilo izraženo već pri najnižim koncentracijama, SRB test pokazuje jasniji pad tek od 10 ppm. Ova razlika je očekivana imajući u vidu da ab112118 test primarno procenjuje metaboličku aktivnost, dok SRB test meri ukupni proteinski sadržaj ćelija. Zbog toga SRB rezultat sugerise da pri nižim koncentracijama može doći do metaboličkih promena pre izraženog smanjenja ukupne ćelijske mase, dok se pri koncentracijama od 10 ppm i višim ispoljava jasan citotoksični efekat.

Kod HeLa ćelija SI-Ag nije izazvao statistički značajne promene vijabilnosti prema SRB testu. Vrednosti su unutar celog koncentracionog opsega bile promenljive, ali bez jasnog koncentraciono-zavisnog obrasca. Statistička analiza nije potvrdila značajan efekat tretmana ($p > 0,05$). Ovi rezultati ukazuju da SI-Ag, u uslovima SRB testa, ne dovodi do značajnog smanjenja ukupne ćelijske mase HeLa ćelija, iako su prethodno u ab112118 testu pri višim koncentracijama registrovane izraženije promene metaboličke aktivnosti.

Kod A549 ćelija SRB test je pokazao statistički značajan efekat SI-Ag tretmana, ali sa manje izraženim citotoksičnim obrascem nego što je uočeno u ab112118 testu. Zanimljivo je da su pri 30 i 40 ppm vrednosti bile iznad kontrolnog nivoa, odnosno $109,06 \pm 7,83\%$ i $113,81 \pm 10,61\%$, dok je pri 50 ppm vijabilnost ponovo bila bliska kontroli i iznosila je $91,37 \pm 4,99\%$. Statistička analiza je pokazala značajan efekat tretmana, $F(8,18) = 4,07$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,64$, ali eksperimentalni obrazac ne ukazuje na jednostavno koncentraciono-zavisno smanjenje vijabilnosti. U poređenju sa ab112118 testom, gde je kod A549 ćelija SI-Ag izazvao smanjenje metaboličke aktivnosti pri koncentracijama iznad 10 ppm, SRB test pokazuje očuvan ili čak povećan proteinski sadržaj pri istim koncentracijama, što ukazuje da smanjenje metaboličke aktivnosti ne mora nužno biti praćeno proporcionalnim smanjenjem ukupne ćelijske mase.

Tabela 13. Procenat ćelijske vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija (SRB) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim SI-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	93,90	95,57	110,43
	101,42	111,36	91,22
	104,68	93,06	98,35
	100,00±5,53^b	100,00±9,92	100,00±9,71^{abc}
0,01 ppm	114,95	97,73	106,33
	84,88	89,83	89,71
	103,68	65,43	93,81
	101,17±15,19^b	84,33±16,84	96,62±8,66^{abc}
0,1 ppm	98,41	73,33	117,12
	78,61	88,40	95,11
	78,61	88,04	84,32
	85,21±11,43^b	83,25±8,60	98,85±16,72^{abc}
1 ppm	101,17	98,44	84,53
	78,86	87,32	78,49
	84,88	89,11	82,59
	88,30±11,54^b	91,63±5,97	81,87±3,09^a
10 ppm	41,02	87,32	96,19
	34,75	101,67	88,20
	40,27	81,22	82,59
	38,68±3,42^a	90,07±10,50	88,99±6,83^{abc}
20 ppm	43,02	90,91	90,79
	39,77	99,16	84,75
	40,52	103,47	85,61
	41,10±1,71^a	97,85±6,38	87,05±3,27^{ab}
30 ppm	43,27	104,90	110,22
	34,75	98,44	116,26
	35,25	100,96	100,72
	37,76±4,78^a	101,44±3,26	109,06±7,83^{bc}
40 ppm	42,52	75,48	112,81
	33,00	92,70	124,89
	34,25	97,73	103,74
	36,59±5,17^a	88,64±11,67	113,81±10,61^c
50 ppm	40,27	68,66	96,62
	33,25	86,24	86,69
	40,52	103,47	90,79
	38,01±4,13^a	86,12±17,40	91,37±4,99^{abc}
MMC	71,85	55,74	73,09
	59,82	61,12	54,10
	57,31	79,43	71,15
	62,99±7,77	65,43±12,42	66,12±10,45

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Korelacionom analizom nisu utvrđene korelacije između vijabilnosti merene SRB testom i ROS nivoa kod svih ispitivanih ćelijskih linija nakon tretmana sa SI-Ag što ukazuje da se citotoksičnost nanočestica ne može direktno povezati sa promenama oksidativnog statusa ćelija.

Tretman JR-Ag (Tabela 14) doveo je do smanjenja vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija, pri čemu su uočeni različiti obrasci odgovora u zavisnosti od ćelijske linije. Kao i kod prethodno analiziranog SI-Ag, validnost testa potvrđena je primenom pozitivne kontrole, odnosno značajnim smanjenjem vijabilnosti nakon tretmana MMC u odnosu na kontrolu kod sve tri ćelijske linije: MRC-5 ($p = 0,003$), HeLa ($p = 0,02$) i A549 ($p = 0,01$).

Statistička analiza potvrdila je značajan efekat JR-Ag na vijabilnost MRC-5 ćelija, $F(8,18) = 32,37$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,93$. Utvrđen je izražen pad vijabilnosti ćelija, naročito pri koncentracijama od 10 ppm i višim. Međutim, u poređenju sa SI-Ag, JR-Ag je već pri 0,01 ppm doveo do umerenog smanjenja vijabilnosti, dok je kod SI-Ag pri ovoj koncentraciji vijabilnost bila približna kontroli.

Rezultati pokazuju ukazuje da je najveći pad vijabilnosti utvrđen u opsegu od 10 do 50 ppm, gde se vrednosti zadržavaju na približno 30–40% kontrole. Ovaj rezultat ukazuje na izražen citotoksični efekat JR-Ag u MRC-5 ćelijama.

Kod HeLa ćelija JR-Ag tretman je pokazao izraženiji efekat u odnosu na SI-Ag. Dok SI-Ag nije doveo do statistički značajnih promena vijabilnosti HeLa ćelija, JR-Ag je izazvao značajne efekte, $F(8,18) = 16,34$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,88$. Pri 0,01 ppm vijabilnost je iznosila $50,96 \pm 4,85\%$, što ukazuje na izraženo smanjenje već pri najnižoj koncentraciji. Pri 0,1 ppm vrednost je porasla na $65,55 \pm 9,56\%$, dok je pri 1 ppm iznosila $87,92 \pm 6,30\%$. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu utvrđene su za sve koncentracije osim 1 i 10 ppm. Ovi rezultati pokazuju da JR-Ag u HeLa ćelijama, za razliku od SI-Ag, dovodi do jasnog smanjenja vijabilnosti, naročito pri najnižoj i najvišim koncentracijama.

Kod A549 ćelija tretman JR-Ag nanočesticama je izazvao statistički značajne efekte, $F(8,18) = 4,56$; $p < 0,01$; $\eta^2 = 0,67$. Odgovor ćelija na JR-Ag bio je blaži, pri 0,01 ppm vijabilnost je smanjena na $65,40 \pm 7,24\%$, dok je najizraženiji pad u odnosu na kontrolu zabeležen pri 0,1 ppm, sa vrednošću od $60,36 \pm 3,18\%$. U poređenju sa SI-Ag, koji je kod A549 ćelija pokazao statistički značajan efekat bez jasnog smanjenja ćelijske mase pri višim koncentracijama, JR-Ag je doveo do umerenog smanjenja vijabilnosti, posebno pri niskim koncentracijama. Ipak, ovaj efekat nije pokazao stabilan koncentraciono-zavisan obrazac.

Tabela 14. Procenat ćelijske vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija (SRB) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim JR-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	93,90	95,57	110,43
	101,42	111,36	91,22
	104,68	93,06	98,35
	100,00±5,53^c	100,00±9,92^e	100,00±9,71^b
0,01 ppm	65,58	55,74	73,74
	67,59	51,08	61,65
	79,37	46,05	60,79
	70,84±7,45^b	50,96±4,85^{ad}	65,40±7,24^a
0,1 ppm	81,12	69,38	56,69
	60,57	54,67	62,09
	81,87	72,61	62,30
	74,52±12,09^b	65,55±9,56^{abc}	60,36±3,18^a
1 ppm	96,41	94,50	77,19
	74,85	81,94	87,12
	77,61	87,32	76,98
	82,96±11,73^{bc}	87,92±6,30^{ce}	80,43±5,80^{ab}
10 ppm	36,26	70,81	83,67
	33,50	75,48	81,51
	39,77	88,76	76,76
	36,51±3,14^a	78,35±9,31^{bce}	80,65±3,53^{ab}
20 ppm	38,51	82,30	89,71
	37,26	61,48	85,40
	41,52	73,33	64,89
	39,10±2,19^a	72,37±10,44^{abc}	80,00±13,26^{ab}
30 ppm	32,75	74,76	81,94
	36,76	56,46	89,93
	36,01	61,12	65,54
	35,17±2,13^a	64,11±9,51^{ab}	79,14±12,43^{ab}
40 ppm	33,75	58,25	98,56
	46,03	47,13	64,24
	45,78	55,02	92,52
	41,85±7,02^a	53,47±5,72^{ad}	85,11±18,32^{ab}
50 ppm	39,52	37,44	67,70
	35,00	42,11	61,01
	20,97	42,82	65,97
	31,83±9,67^a	40,79±2,92^d	64,89±3,47^a
MMC	71,85	55,74	73,09
	59,82	61,12	54,10
	57,31	79,43	71,15
	62,99±7,77	65,43±12,42	66,12±10,45

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Korelacionom analizom nisu utvrđene korelacije između vijabilnosti merene SRB testom i ROS nivoa kod svih ispitivanih ćelijskih linija nakon tretmana sa JR-Ag što ukazuje kao i nakon tretmana SI-Ag nanočesticama da se citotoksičnost nanočestica ne može direktno povezati sa oksidativnim statusom ćelija.

Kod MRC-5 ćelija statistička analiza je potvrdila značajan efekat AS-Ag na vijabilnost, $F(8,18) = 59,31$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,96$. AS-Ag je izazvao postepeno smanjenje vijabilnosti sa porastom koncentracije. Pri najnižim koncentracijama od 0,01, 0,1 i 1 ppm vrednosti su iznosile $80,28 \pm 10,19\%$, $72,01 \pm 2,27\%$ i $73,43 \pm 2,68\%$, što ukazuje na umeren pad ćelijske mase već u nižem koncentracionom opsegu. U poređenju sa SI-Ag i JR-Ag, AS-Ag pokazuje sličan efekat kod MRC-5 ćelija, odnosno smanjenje vijabilnosti, ali sa nešto postepenijim koncentracionim tokom.

Kod HeLa ćelija AS-Ag nije doveo do jednostavnog koncentraciono-zavisnog smanjenja vijabilnosti. Statistička analiza je pokazala značajan efekat tretmana, $F(8,18) = 8,21$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,78$. Statistički značajne promene u odnosu na kontrolu zabeležene su pri koncentracijama od 0,01 i 40 ppm. Ovakav rezultat ukazuje da AS-Ag kod HeLa ćelija izaziva promenljiv odgovor, bez stabilnog pada vijabilnosti pri najvišoj koncentraciji. U odnosu na JR-Ag, koji je doveo do jasnijeg smanjenja HeLa vijabilnosti u većem koncentracionom opsegu, AS-Ag pokazuje blaži i manje konzistentan efekat.

Kod A549 ćelija AS-Ag tretman nije pokazao statistički značaj. Najniža srednja vrednost zabeležena je pri 10 ppm i iznosila je $74,60 \pm 13,52\%$, nakon čega su vrednosti ostale u opsegu od $77,84 \pm 6,95\%$ do $84,46 \pm 7,26\%$. Ovi rezultati ukazuju da AS-Ag nanočestice u A549 ćelijama ne izazivaju značajan pad vijabilnosti.

Tabela 15. Procenat ćelijske vijabilnosti MRC-5, HeLa i A549 ćelija (SRB) u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim AS-Ag

	<i>MRC-5</i>	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>
Kontrola	93,90	95,57	110,43
	101,42	111,36	91,22
	104,68	93,06	98,35
	100,00±5,53^c	100,00±9,92^e	100,00±9,71^b
0,01 ppm	88,39	68,30	84,75
	83,63	58,25	93,60
	68,84	77,27	78,92
	80,28±10,19^b	67,94±9,51^b	85,76±7,39^{ab}
0,1 ppm	74,60	85,89	94,68
	70,34	96,65	96,83
	71,09	94,14	82,37
	72,01±2,27^b	92,22±5,63^a	91,29±7,80^{ab}
1 ppm	71,09	101,32	92,73
	76,36	99,16	80,22
	72,85	111,00	88,20
	73,43±2,68^b	103,83±6,31^a	87,05±6,34^{ab}
10 ppm	59,82	82,30	59,06
	70,34	94,50	83,67
	70,84	90,55	81,08
	67,00±6,23^b	89,11±6,23^{ac}	74,60±13,52^a
20 ppm	40,27	81,58	67,48
	43,78	93,42	88,85
	44,53	79,78	78,92
	42,86±2,27^a	84,93±7,41^{abc}	78,42±10,69^{ab}
30 ppm	39,52	74,76	76,12
	42,52	89,47	89,28
	43,53	92,34	87,99
	41,85±2,09^a	85,53±9,43^{abc}	84,46±7,26^{ab}
40 ppm	29,49	67,94	71,37
	37,76	69,38	76,98
	33,75	74,04	85,18
	33,67±4,14^a	70,45±3,19^{bc}	77,84±6,95^{ab}
50 ppm	20,72	98,44	88,35
	35,00	97,37	85,40
	30,74	88,04	76,12
	28,82±7,33^a	94,62±5,72^a	83,29±6,39^{ab}
MMC	71,85	55,74	73,09
	59,82	61,12	54,10
	57,31	79,43	71,15
	62,99±7,77	65,43±12,42	66,12±10,45

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Pozitivna korelacija između vijabilnosti i ROS nivoa ćelija utvrđena je kod MRC-5 ćelija nakon tretmana AS-Ag ($r = 0,74$; $p < 0,001$). Rezultati pokazuju da je pad nivoa ROS posledica smanjenja vijabilnih ćelija.

Kod HeLa ćelija i A549 nije utvrđena korelaciona povezanost između ispitivanih parametara.

5.2.3. Uticaj na aktivnost acetilholinesteraze

Uticaj SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag na aktivnost AChE ispitan je praćenjem procenta inhibicije AChE u odnosu na kontrolu (Tabela 16). U kontrolnim uzorcima nije zabeležena inhibicija enzima, odnosno vrednosti su bile bliske nuli, što ukazuje na stabilnost eksperimentalnog sistema i odsustvo spontanog smanjenja enzimске aktivnosti u kontrolnim uslovima.

Tretman SI-Ag doveo je do izražene inhibicije AChE u celom ispitivanom koncentracionom opsegu. Već pri najnižim koncentracijama od 0,01 i 0,1 ppm inhibicija je iznosila $37,76 \pm 1,05\%$ i $39,67 \pm 2,97\%$, što ukazuje da SI-Ag pokazuje značajan inhibitorni potencijal i pri vrlo niskim koncentracijama. Pri 1 ppm inhibicija je dodatno porasla, dok je pri koncentracijama od 10 do 50 ppm dostigla veoma visoke vrednosti, uglavnom oko 97–100%. Što pokazuje da SI-Ag izaziva naglo povećanje inhibicije AChE između 0,1 i 10 ppm, nakon čega se dostiže plato gotovo potpune inhibicije enzima.

Statistička analiza potvrdila je veoma izražen efekat SI-Ag na inhibiciju AChE, $F(8,18) = 763,70$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,997062$. Sve ispitivane koncentracije pokazale su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, što potvrđuje da SI-Ag ima snažan i koncentraciono zavisen inhibitorni efekat na AChE. Visoka vrednost η^2 dodatno ukazuje da se najveći deo ukupne varijabilnosti rezultata može pripisati efektu tretmana.

Za JR-Ag je uočen drugačiji obrazac odgovora pri najnižim koncentracijama. Pri 0,01 i 0,1 ppm zabeležene su negativne vrednosti inhibicije, odnosno $-20,77 \pm 1,40\%$ i $-18,44 \pm 1,02\%$. Ovakav rezultat ukazuje da u ovom koncentracionom opsegu JR-Ag nije inhibirao aktivnost AChE, već je izmerena aktivnost enzima bila viša u odnosu na kontrolu. Ovaj efekat može biti posledica interakcije nanočestica sa komponentama reakcione smeše, promena u optičkom signalu ili blage stimulacije očitane enzimске aktivnosti, pa ga treba tumačiti oprezno. Međutim, već pri 1 ppm dolazi do jasne inhibicije AChE od $28,22 \pm 1,59\%$, dok je pri 10 ppm inhibicija naglo porasla na $94,07 \pm 0,89\%$. Pri koncentracijama od 20 do 50 ppm inhibicija se održavala na veoma visokom nivou, sa vrednostima od $96,23 \pm 1,39\%$ do $101,49 \pm 2,58\%$.

Statistička analiza pokazala je izuzetno snažan efekat JR-Ag na inhibiciju AChE, $F(8,18) = 2741,12$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,999180$. Sve ispitivane koncentracije bile su statistički značajno različite u odnosu na kontrolu. Iako su niske koncentracije pokazale negativne vrednosti inhibicije, statistička značajnost ukazuje da i u ovom opsegu JR-Ag značajno menja očitane aktivnosti enzima, ali ne u pravcu inhibicije. Pri koncentracijama od 10 ppm i višim, JR-Ag pokazuje inhibitorni efekat sličan SI-Ag, sa gotovo potpunom inhibicijom AChE.

AS-Ag je pokazao blaži inhibitorni potencijal u poređenju sa SI-Ag i JR-Ag. Pri najnižim koncentracijama od 0,01 i 0,1 ppm inhibicija AChE iznosila je $8,03 \pm 1,15\%$ i $8,77 \pm 1,07\%$, što ukazuje na slab efekat u ovom koncentracionom opsegu. Pri 1 ppm inhibicija je porasla na $29,82 \pm 3,29\%$, dok su pri koncentracijama od 10 do 50 ppm vrednosti bile u opsegu od približno 40 do 47%. Najviša srednja vrednost inhibicije zabeležena je pri 30 ppm. Za razliku od SI-Ag i JR-Ag, kod kojih pri višim koncentracijama dolazi do gotovo potpune inhibicije enzima, AS-Ag dostiže umeren plato inhibicije i ne prelazi približno polovinu ukupne enzimске aktivnosti.

Statistička analiza potvrdila je značajan efekat AS-Ag na inhibiciju AChE, $F(8,18) = 272,642$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,991815$. Sve ispitivane koncentracije pokazale su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, što potvrđuje da AS-Ag značajno utiče na aktivnost AChE. Ipak, intenzitet inhibicije bio je znatno slabiji nego kod SI-Ag i JR-Ag, posebno u višem koncentracionom opsegu.

Komparativno posmatrano, SI-Ag i JR-Ag pokazali su najizraženiji inhibitorni potencijal prema AChE, ali sa različitim početnim obrascem delovanja. SI-Ag je izazvao značajnu inhibiciju već pri 0,01 ppm, dok je JR-Ag pri najnižim koncentracijama pokazao negativne vrednosti inhibicije, nakon čega je od 1 ppm prešao u jasan inhibitorni režim. Pri koncentracijama od 10 ppm i višim oba materijala su dovela do gotovo potpune inhibicije AChE, što ukazuje na snažan neuroaktivni potencijal ovih nanočestica u direktnom enzimskom sistemu. Nasuprot tome, AS-Ag je izazvao statistički značajnu, ali umerenu inhibiciju AChE, sa maksimalnim vrednostima ispod 50%.

Ovi rezultati ukazuju da efekat AgNPs na AChE zavisi od biljnog prekursora korišćenog u sintezi. SI-Ag i JR-Ag pokazuju visok potencijal za direktnu inhibiciju AChE, dok AS-Ag deluje znatno slabije. Razlike mogu biti posledica različite površinske hemije nanočestica, prisustva bioaktivnih komponenti zaostalih iz biljnih ekstrakata, kao i različite sposobnosti interakcije nanočestica sa aktivnim ili perifernim anjonskim mestom enzima.

Tabela 16. Procenat inhibicije AChE u odnosu na kontrolu sa SI-Ag, JR-Ag i AS-Ag

Kontrola	1,43	0,49	-1,68
	-2,48	0,96	0,99
	1,45	-1,45	0,69
	0,13±2,26^c	0,00±1,28^e	0,00±1,46^d
	SI-Ag	JR-Ag	AS-Ag
0,01 ppm	37,12	-22,00	9,34
	38,97	-19,24	7,54
	37,19	-21,07	7,21
	37,76±1,05^b	-20,77±1,40^c	8,03±1,15^c
0,1 ppm	41,69	-18,50	8,16
	36,25	-19,43	8,15
	41,07	-17,39	10,00
	39,67±2,97^b	-18,44±1,02^c	8,77±1,07^c
1 ppm	70,00	26,59	30,25
	67,10	29,76	32,87
	67,32	28,31	26,34
	68,14±1,61^d	28,22±1,59^f	29,82±3,29^e
10 ppm	99,57	95,10	41,25
	102,64	93,50	39,12
	96,50	93,61	39,18
	99,57±3,07^a	94,07±0,89^d	39,85±1,21^a
20 ppm	97,55	97,55	44,44
	102,49	96,36	46,89
	98,67	94,78	45,05
	99,57±2,59^a	96,23±1,39^{ad}	45,46±1,28^{ab}
30 ppm	95,13	99,00	48,94
	99,03	102,00	45,82
	97,50	99,00	45,85
	97,22±1,97^a	100,00±1,73^{ab}	46,87±1,79^b
40 ppm	97,44	96,58	43,29
	95,89	103,00	47,69
	96,62	100,00	45,58
	96,65±0,78^a	99,86±3,21^{ab}	45,52±2,20^{ab}
50 ppm	103,66	98,52	46,52
	98,26	102,69	45,10
	98,08	103,25	40,68
	100,00±3,17^a	101,49±2,58^b	44,10±3,05^{ab}

Srednja vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) na osnovu one-way ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa

Dodatna analiza inhibicije AChE prikazana je kroz koncentraciono-zavisne krive odgovora i procenu IC₅₀ vrednosti (Slika 14), odnosno koncentracije AgNPs koja dovodi do 50% inhibicije enzimske aktivnosti. Ovaj pristup omogućava direktnije poređenje inhibitornog potencijala ispitivanih

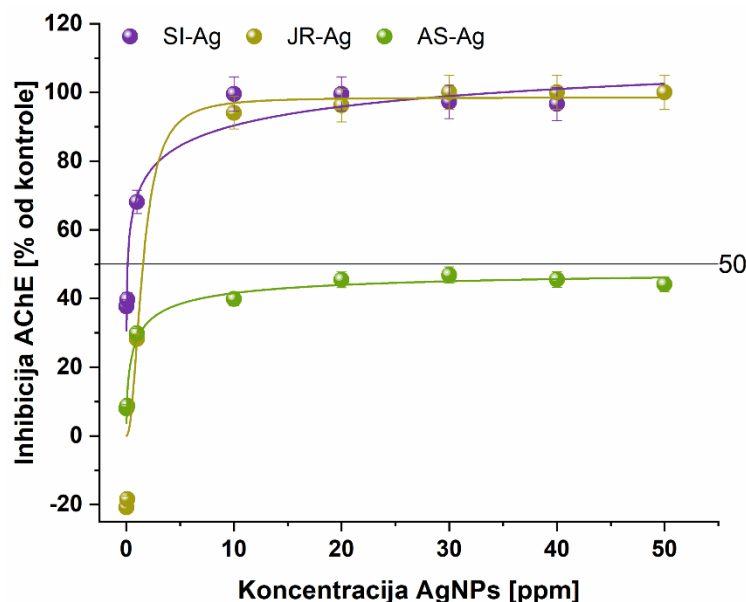
AgNPs, jer ne posmatra samo maksimalni efekat pri visokim koncentracijama, već i efikasnost materijala pri nižem koncentracionom opsegu.

Za SI-Ag dobijena je najniža IC_{50} vrednost, 0,12 ppm, što ukazuje na najizraženiji inhibicioni potencijal prema AChE. Ovaj rezultat je u skladu sa eksperimentalnim podacima, gde je značajna inhibicija enzima zabeležena već pri najnižim ispitivanim koncentracijama, dok je pri koncentracijama od 10 ppm i višim dostignuta gotovo potpuna inhibicija. Nagli porast krive pri niskim koncentracijama pokazuje da je AChE veoma osetljiva na prisustvo SI-Ag i da je za postizanje polovine maksimalnog inhibicionog efekta potrebna vrlo mala koncentracija.

Kod JR-Ag IC_{50} vrednost iznosila je 1,483 ppm, što ukazuje na snažan inhibicioni efekat, ali slabiji u poređenju sa SI-Ag. Za razliku od SI-Ag, JR-Ag pri najnižim koncentracijama nije pokazao inhibiciju AChE, već su zabeležene negativne vrednosti inhibicije, nakon čega se inhibicioni efekat naglo povećava i pri koncentracijama od 10 ppm i višim dostiže gotovo potpunu inhibiciju enzima. Ovakav obrazac ukazuje da JR-Ag zahteva višu koncentraciju za dostizanje praga značajne inhibicije, ali nakon toga pokazuje inhibicioni kapacitet uporediv sa SI-Ag.

Za AS-Ag IC_{50} vrednost nije dostignuta u ispitivanom koncentracionom opsegu. Maksimalne vrednosti inhibicije bile su ispod 50%, čak i pri najvišim koncentracijama, što ukazuje da AS-Ag ima znatno slabiji inhibicioni potencijal prema AChE u poređenju sa SI-Ag i JR-Ag. Kriva odgovora za AS-Ag pokazuje postepeni porast inhibicije pri nižim koncentracijama, nakon čega se formira plato na približno 40–47% inhibicije. Ovaj rezultat potvrđuje da AS-Ag značajno utiče na aktivnost AChE, ali ne dovodi do potpune ili visokointenzivne inhibicije enzima u primenjenom koncentracionom opsegu.

Komparativno posmatrano, inhibicioni potencijal ispitivanih nanočestica prema AChE opada redosledom SI-Ag > JR-Ag > AS-Ag. SI-Ag se izdvaja kao najpotentniji inhibitor, sa IC_{50} vrednošću u sub-ppm opsegu, dok JR-Ag pokazuje snažan efekat tek nakon dostizanja višeg koncentracionog praga. AS-Ag, nasuprot tome, pokazuje ograničen inhibicioni kapacitet i ne dostiže 50% inhibicije. Ovi rezultati ukazuju da razlike u biljnom prekursoru i posledično u površinskoj hemiji AgNPs značajno utiču na njihov direktni efekat na AChE. Posebno je važno da se ovakav inhibicioni potencijal ne tumači samo kroz citotoksičnost, jer je AChE test sproveden u direktnom enzimskom sistemu, bez ćelijske barijere i intracelularnih adaptivnih mehanizama. Zato IC_{50} vrednosti predstavljaju pokazatelj direktne enzimske reaktivnosti AgNPs i dopunjuju podatke dobijene ćelijskim testovima.



6.
Slika 14. Inhibicija AChE u odnosu na kontrolu u zavisnosti od koncentracije AgNPs

5.3. Fizičko-hemijska karakterizacija ugljeničnih materijala

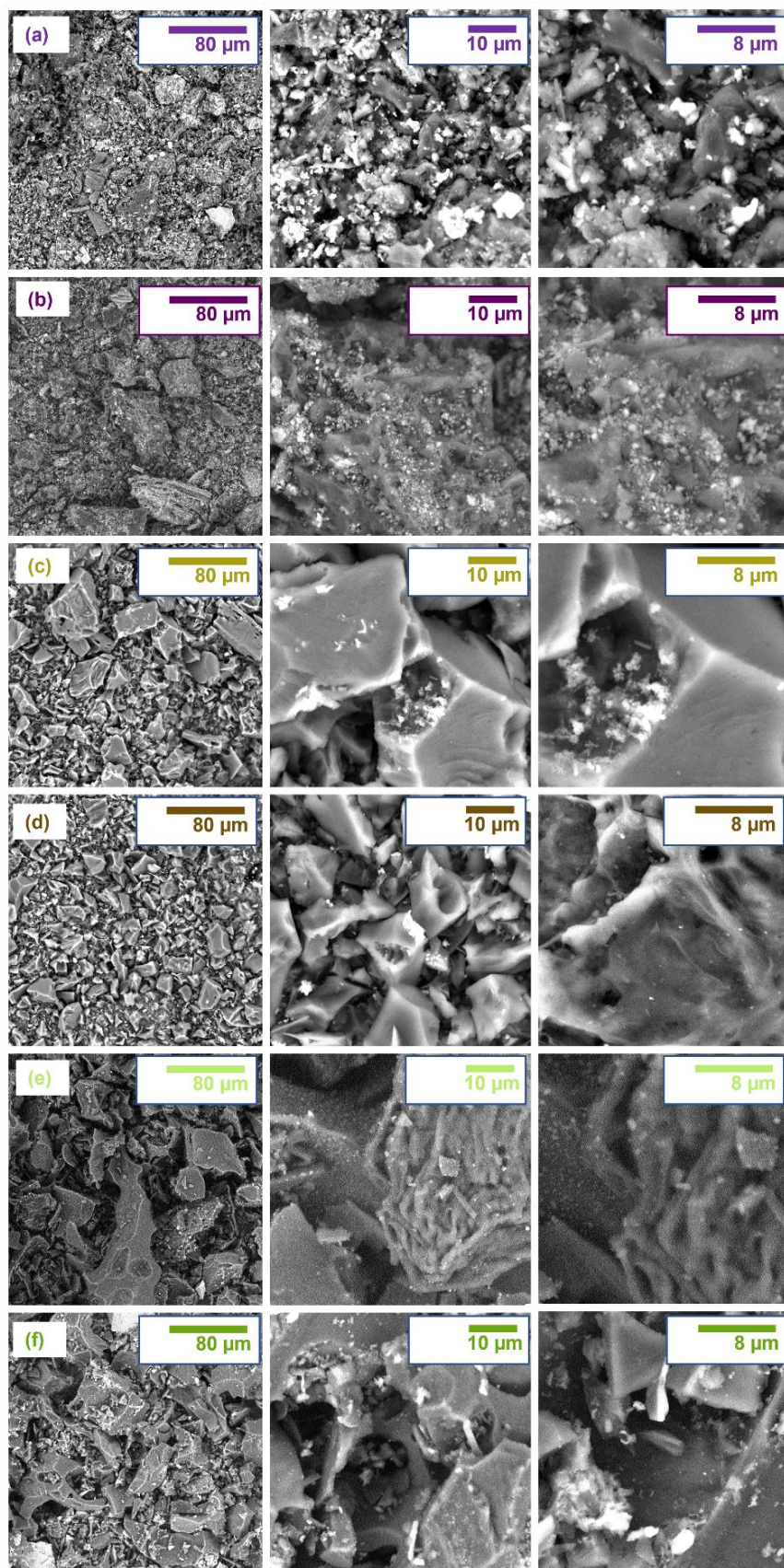
Morfologija sintetisanih materijala ispitivana je SEM analizom pri uvećanjima od 1000×, 5000× i 10000× (Slika 15). SEM mikrografije ukazuju na izražene razlike u površinskoj morfologiji i teksturi između uzoraka, kao i na značajan uticaj temperature karbonizacije na strukturna svojstva materijala.

Kod SI uzoraka, materijal karbonizovan na 400 °C pokazuje heterogenu i relativno zbijenu strukturu sastavljenu od nepravilnih aglomerata čestica različitih dimenzija. Površina je izraženo hrapava, bez velikih šupljina, dok su fine čestice raspoređene unutar matrice, što ukazuje na ograničen stepen termičke razgradnje i strukturne reorganizacije. Pri većim uvećanjima uočavaju se sitni fragmenti i delimično očuvane strukture, bez jasno razvijene poroznosti. Nasuprot tome, uzorak SI900 pokazuje izraženije strukturne promene usled više temperature karbonizacije. Površina je kompaktnija, ali istovremeno reorganizovana, sa uočljivim spajanjem čestica i formiranjem kontinualnije matrice. Prisustvo finih granula i površinskih naslaga je izraženije, dok pojedine oblasti deluju delimično zaglađeno, što ukazuje na viši stepen karbonizacije. Iako makroporoznost nije dominantno razvijena, primećuje se veći stepen strukturne homogenizacije i promene u raspodeli čestica. Ovi rezultati ukazuju da povećanje temperature karbonizacije kod SI uzoraka dovodi do izraženije strukturne reorganizacije, bolje povezanosti čestica i delimične homogenizacije površine, što može imati značajan uticaj na njihova funkcionalna i adsorpciona svojstva.

Sličan uticaj temperature uočen je i kod JR materijala. Uzorak JR400 ima relativno glatku, pločastu i kompaktnu površinu, dok JR900 pokazuje nepravilniju i izraženije teksturisano morfologiju, uz prisustvo površinskih defekata. Ovakve promene ukazuju na intenzivniju strukturnu reorganizaciju i razvoj poroznije strukture pri višim temperaturama karbonizacije.

Kod AS materijala, AS400 karakteriše kompaktna i heterogena morfologija sa aglomerisanim česticama i ograničenom vidljivom poroznošću. Nasuprot tome, AS900 pokazuje fragmentisaniju i izraženije poroznu strukturu, sa prisustvom šupljina, što ukazuje na intenzivnu termičku razgradnju i isparenje organskih komponenti pri višoj temperaturi.

Generalno posmatrano, povećanje temperature karbonizacije sa 400 na 900 °C dovodi do značajnih morfoloških promena kod svih ispitivanih materijala, koje se ogledaju u razvoju porozne strukture, formiranju defekata i intenzivnijoj strukturnoj reorganizaciji.



Slika 15. SEM mikrofografije: (a) SI400, (b) SI900, (c) JR400, (d) JR900, (e) AS400 i (f) AS900 na uvećanjima 1000 $\times$, 5000 $\times$ i 10000 $\times$ redom sa leva na desno

Elementarni sastav ispitivanih materijala, određen EDX analizom (Tabela 17), pokazuje da je ugljenik dominantan element u svim uzorcima, ali sa značajnim razlikama u zavisnosti od tipa prekursora i temperature karbonizacije.

Kod SI uzoraka, sadržaj ugljenika ostaje gotovo konstantan sa porastom temperature karbonizacije (59,63%-59,24%), što ukazuje da povećanje temperature ne dovodi do dodatnog obogaćenja ugljenikom. Sadržaj kiseonika ostaje visok i čak blago raste (26,74-27,58%), što sugerise ograničen stepen deoksigenacije. Nasuprot tome, sadržaj azota se značajno smanjuje (7,00-2,55%), što ukazuje na razgradnju azotnih funkcionalnih grupa i njihovo uklanjanje tokom termičkog tretmana, Promene su izražene i kod neorganskih elemenata. Sadržaji Mg i Ca se značajno povećavaju (Mg: 1,05-4,05%; Ca: 2,58-4,17%), što se može objasniti gubitkom organske komponente, Istovremeno, sadržaji K, Na i Cl se smanjuju, dok su P i S potpuno uklonjeni u uzorku SI900. Sadržaj SI ostaje relativno stabilan, Ovakvi rezultati ukazuju na izraženu preraspodelu neorganskih komponenti i specifičan tok termičke transformacije, koji može značajno uticati na površinska svojstva materijala.

JR materijali se odlikuju visokim sadržajem ugljenika, koji se povećava sa 81,06% na 84,99%, što ukazuje na efikasnu karbonizaciju. Istovremeno, sadržaj kiseonika se značajno smanjuje (13,94-7,27%), potvrđujući progresivnu deoksigenaciju i strukturno uređenje ugljenične matrice. Za razliku od SI materijala, kod JR materijala dolazi do povećanja sadržaja azota (4,66-6,78%), što može ukazivati na stabilizaciju azotnih funkcionalnih grupa u strukturi pri višim temperaturama. Ostali elementi prisutni su u tragovima (<1%), što ukazuje na nizak sadržaj mineralnih ostataka.

AS materijali pokazuju umeren sadržaj ugljenika, koji raste sa 71,95% (AS400) na 75,88% (AS900), dok sadržaj kiseonika ostaje praktično nepromenjen (~13,9%). Ovakvo ponašanje ukazuje na ograničenu deoksigenaciju tokom karbonizacije, Sadržaj azota se značajno smanjuje (11,02-6,32%), što sugerise da su azotne funkcionalne grupe termički nestabilne pri višim temperaturama. Za razliku od JR materijala, AS serija sadrži nešto veće količine kalijuma i fosfora, čiji sadržaj čak raste sa povećanjem temperature (K: 2,26-2,84%; P: 0,47-0,63%). Ostali elementi (Mg, Na, S, Si i Cl) prisutni su u malim količinama. Ovi rezultati ukazuju na drugačiji mehanizam termičke transformacije u odnosu na JR i SI materijale, što se može pripisati specifičnostima početnog prekursora.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da priroda prekursora ima ključnu ulogu u određivanju toka karbonizacije i konačnog elementarnog sastava materijala. Dok JR materijali pokazuju tipično ponašanje sa povećanjem sadržaja ugljenika i smanjenjem kiseonika. SI i AS materijali karakteriše ograničena deoksigenacija i izražene promene u sadržaju azota i neorganskih komponenti, što može imati značajan uticaj na njihova funkcionalna i adsorpciona svojstva.

Tabela 17. Elementarni sastav ispitivanih ugljeničnih materijala

	Atomski procent [%]										
	C	O	N	K	Mg	P	Ca	Na	S	Si	Cl
SI400	59,63	26,74	7,00	1,03	1,05	0,45	2,58	0,67	0,12	0,48	0,26
SI900	59,24	27,58	2,55	0,56	4,05	0,00	4,17	0,33	0,00	0,61	0,02
JR400	81,06	13,94	4,66	0,14	0,07	0,06	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
JR900	84,99	7,27	6,78	0,45	0,08	0,15	0,21	0,00	0,02	0,03	0,02
AS400	71,95	13,90	11,02	2,26	0,09	0,47	0,00	0,05	0,09	0,04	0,13
AS900	75,88	13,83	6,32	2,84	0,21	0,63	0,00	0,10	0,07	0,08	0,04

Rezultati BET i NLDFT analize ispitivanih materijala ukazuju na evidentan uticaj temperature karbonizacije na razvoj specifične površine, zapremine pora i njihove raspodele (Tabela 18). Dobijeni rezultati dosledno pokazuju da prelazak sa 400 °C na 900 °C dovodi do izraženog formiranja porozne strukture, pri čemu se posebno ističe razvoj mikroporoznosti i povećanje dostupnih adsorpcionih mesta. Povećanjem temperature karbonizacije dolazi do značajnog porasta specifične površine i ukupne

zapremine pora, uz istovremeno smanjenje prosečnog prečnika pora, što ukazuje na prelazak iz dominantno mezoporozne strukture kod materijala karbonizovanih na 400 °C ka pretežno mikroporoznoj strukturi kod uzoraka dobijenih na 900 °C.

Uzorci karbonizovani na 400 °C karakterišu se veoma niskim vrednostima specifične površine i zapremine pora, što ukazuje na nedovoljno razvijenu poroznu strukturu pri ovoj temperaturi. SI400 pokazuje specifičnu površinu od 4,9 m² g⁻¹ i zapreminu pora od 0,024 cm³ g⁻¹, dok JR400 ima nešto višu površinu od 5,59 m² g⁻¹, ali nižu zapreminu pora (0,011 cm³ g⁻¹), AS400 se izdvaja kao najmanje razvijen uzorak, sa svega 1,1 m² g⁻¹ i zapreminom pora od 0,007 cm³ g⁻¹. Prosečni prečnici pora (9,63 nm za SI400, 3,92 nm za JR400 i 12,41 nm za AS400) ukazuju da su ovi materijali pretežno mezoporozni. Ovako niske vrednosti parametara potvrđuju da karbonizacija na 400 °C nije dovoljna za formiranje razvijene porozne površine.

Sa povećanjem temperature karbonizacije na 900 °C dolazi do izraženijih promena. Uzorak SI900 pokazuje značajan porast specifične površine na 295 m² g⁻¹ i zapremine pora na 0,274 cm³ g⁻¹ (BET), odnosno 0,341 cm³ g⁻¹ (NLDFT), uz smanjenje prosečnog prečnika pora na 1,924 nm, što ukazuje na prelazak ka dominantno mikroporoznoj strukturi. Još izraženiji efekat uočen je kod JR900, koji dostiže čak 790 m² g⁻¹ i 0,467 cm³ g⁻¹ (BET), odnosno 0,698 cm³ g⁻¹ (NLDFT), uz prosečan prečnik pora od 1,18 nm, što potvrđuje intenzivan razvoj mikroporoznosti. AS900 takođe pokazuje značajno unapređenje teksturalnih svojstava (177 m² g⁻¹ i 0,145 cm³ g⁻¹ BET; 0,183 cm³ g⁻¹ NLDFT), uz prosečan prečnik pora od 1,64 nm, iako u manjoj meri u poređenju sa JR900.

Tabela 18. Specifične površine, zapremine i dijametar pora određeni BET metodom i ukupne zapremine pora materijala određene NLDFT metodom

Materijal	BET analiza			NLDFT analiza
	S _{BET} [m ² g ⁻¹]	V _{pora} [cm ³ g ⁻¹]	d _{sr} [nm]	V _{pora} [cm ³ g ⁻¹]
SI400	4,9	0,024	9,63	0,022
SI900	295	0,274	1,924	0,341
JR400	5,59	0,011	3,919	0,012
JR900	790	0,467	1,182	0,698
AS400	1,1	0,007	12,41	0,008
AS900	177	0,145	1,640	0,183

Uticaj temperature karbonizacije na strukturne promene materijala ispitan je i primenom FTIR spektroskopije (Slika 16a), rendgenske difrakcije (Slika 16b) i merenjem zeta potencijala u zavisnosti od pH (Slika 16c).

FTIR spektroskopija je korišćena za identifikaciju i poređenje površinskih funkcionalnih grupa u ispitivanim materijalima u opsegu 2000-400 cm⁻¹, Spektri jasno ukazuju na značajne promene u hemijskom sastavu usled povećanja temperature karbonizacije.

FTIR spektar uzorka SI400 karakteriše prisustvo više izraženih apsorpcionih traka, što ukazuje na očuvanje značajnog broja kiseoničnih funkcionalnih grupa nakon karbonizacije na 400 °C. Traka pri 1597 cm⁻¹ može se pripisati vibracijama C=C veza aromatičnih struktura, uz mogući doprinos asimetričnih vibracija karboksilatnih grupa [276]. Izražen maksimum na 1418 cm⁻¹ povezuje se sa simetričnim vibracijama COO⁻ grupa i deformacionim vibracijama alifatičnih C-H veza. Traka na 1314 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo fenolnih i karboksilnih grupa, dok maksimum pri 1053 cm⁻¹ odgovara isteznim vibracijama C-O veza alkohola, etara i drugih kiseoničnih funkcionalnih grupa. Pored toga, u području nižih talasnih brojeva uočavaju se trake pri 872, 782 i 710 cm⁻¹, koje se mogu pripisati vanravanskim vibracijama aromatičnih C-H veza, dok traka oko 570 cm⁻¹ ukazuje na prisustvo neorganskih

komponenti ili vibracija metal-kiseonik veza [276]. Prisustvo ovih traka potvrđuje da površina SI400 poseduje relativno veliki broj funkcionalnih grupa koje mogu predstavljati aktivna mesta za adsorpciju.

Nasuprot tome, spektar uzorka SI900 pokazuje znatno manje izražene apsorpcione trake i gotovo ravan profil bez jasno definisanih maksimuma. U poređenju sa SI400, karakteristične trake u oblastima oko 1600, 1400 i 1000 cm^{-1} značajno su oslabljene, što ukazuje na uklanjanje velikog dela kiseoničnih funkcionalnih grupa tokom karbonizacije na 900 °C. Smanjenje intenziteta ovih traka posledica je procesa dehidratacije, dekarboksilacije i oslobađanja isparljivih komponenti, pri čemu dolazi do formiranja kondenzovanih aromatičnih struktura i povećanja stepena karbonizacije materijala. Odsustvo izraženih maksimuma u spektru SI900 ukazuje na veću hemijsku homogenost površine i manju zastupljenost polarnih funkcionalnih grupa.

Poređenjem uzoraka SI400 i SI900 jasno se uočava da povećanje temperature karbonizacije dovodi do značajne transformacije hemijske strukture materijala. Dok SI400 karakteriše površina bogata kiseoničnim funkcionalnim grupama, koje omogućavaju ostvarivanje vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija sa adsorbatima, kod SI900 dolazi do smanjenja sadržaja ovih grupa i povećanja stepena aromatizacije ugljenične matrice.

Kod uzorka JR400 prisutne su izražene apsorpcione trake u opsegu 1698-1592 cm^{-1} , koje se pripisuju istezanju C=O veza i aromatičnim C=C vibracijama. Dodatno, trake na približno 1428 i 1314 cm^{-1} odgovaraju C-H deformacijama i C-O istezanju, dok TRAKE na 875 i 780 cm^{-1} ukazuju na vanravanske vibracije aromatičnih C-H veza. Slaba traka oko 518 cm^{-1} može se dovesti u vezu sa prisustvom mineralnih komponenti [279]. Povećanjem temperature karbonizacije na 900 °C dolazi do izraženog smanjenja intenziteta većine traka u spektru JR900, što ukazuje na delimičnu eliminaciju kiseoničnih funkcionalnih grupa i formiranje kondenzovane aromatične ugljenične strukture [280]. Sličan trend je uočen i kod AS uzoraka, gde AS400 pokazuje karakteristične trake na 1565, 1433, 1255 i 1106 cm^{-1} , povezane sa aromatičnim C=C i C-O vibracijama, kao i trake u oblasti 875, 690 i 544 cm^{-1} koje se pripisuju aromatičnim strukturama i mogućim mineralnim fazama [279]. Nakon karbonizacije na 900 °C, dolazi do značajnog slabljenja intenziteta ovih traka, što potvrđuje progresivnu karbonizaciju i gubitak površinskih funkcionalnih grupa.

Strukturna analiza SI rendgenskom difrakcijom pokazuje izraženu zavisnost kristalne strukture od temperature karbonizacije. Uzorci dobijeni na 400 °C karakterišu se širokim difrakcionim maksimumom u oblasti 23-25° (2θ), što je tipično za amorfni ugljenik dobijen iz biomase i ukazuje na nizak stepen strukturnog uređenja i prisustvo neuređenih grafenolikih domena [281]. Povećanjem temperature karbonizacije na 900 °C dolazi do sužavanja i intenziviranja (002) refleksije, kao i pojave slabog pika oko 43°, koji se pripisuje (100) ravni grafitne strukture [282]. Ove promene ukazuju na razvoj delimično grafitizovanog materijala i povećanje stepena aromatizacije i strukturnog uređenja. U oba uzorka uočava se izražen difrakcioni pik oko 29°, koji se pripisuje prisustvu kalcijum karbonata [283]. Povećan intenzitet ovog pika kod SI900 sugerise da viša temperatura karbonizacije doprinosi boljoj kristalizaciji i stabilizaciji mineralnih faza, što dodatno doprinosi ukupnoj strukturnoj organizaciji materijala.

Sličan trend uočen je i kod JR materijala. Uzorak JR400 pokazuje širok difrakcioni maksimum u oblasti 23-25°, karakterističan za amorfni ugljenik dobijen iz biomase [284]. Povećanjem temperature karbonizacije na 900 °C dolazi do sužavanja (002) refleksije i pojave slabog pika oko 43° (100), što ukazuje na povećanje stepena strukturnog uređenja i delimičnu grafitizaciju [282]. Istovremeno, prisustvo oštih pikova u oblastima 28–32° i 35–45° ukazuje na kristalne mineralne faze, najverovatnije CaCO_3 [285].

AS materijali pokazuju analogno ponašanje, AS400 karakteriše dominantno amorfna struktura sa širokim difrakcionim maksimumom oko 23-25°, dok AS900 pokazuje izraženije i uže difrakcione pikove, što ukazuje na povećano strukturno uređenje i razvoj grafitnih domena. Kao i kod ostalih uzoraka,

prisustvo pikova u regionima 28-32° i 35-45° može se pripisati kristalnim mineralnim fazama prisutnim u početnoj biomasi.

Povećanje temperature karbonizacije dovodi do prelaza iz amorfne ka delimično grafitizovanoj strukturi kod svih ispitivanih materijala, uz istovremeno povećanje kristalnosti i izraženiju prisutnost stabilnih mineralnih faza.

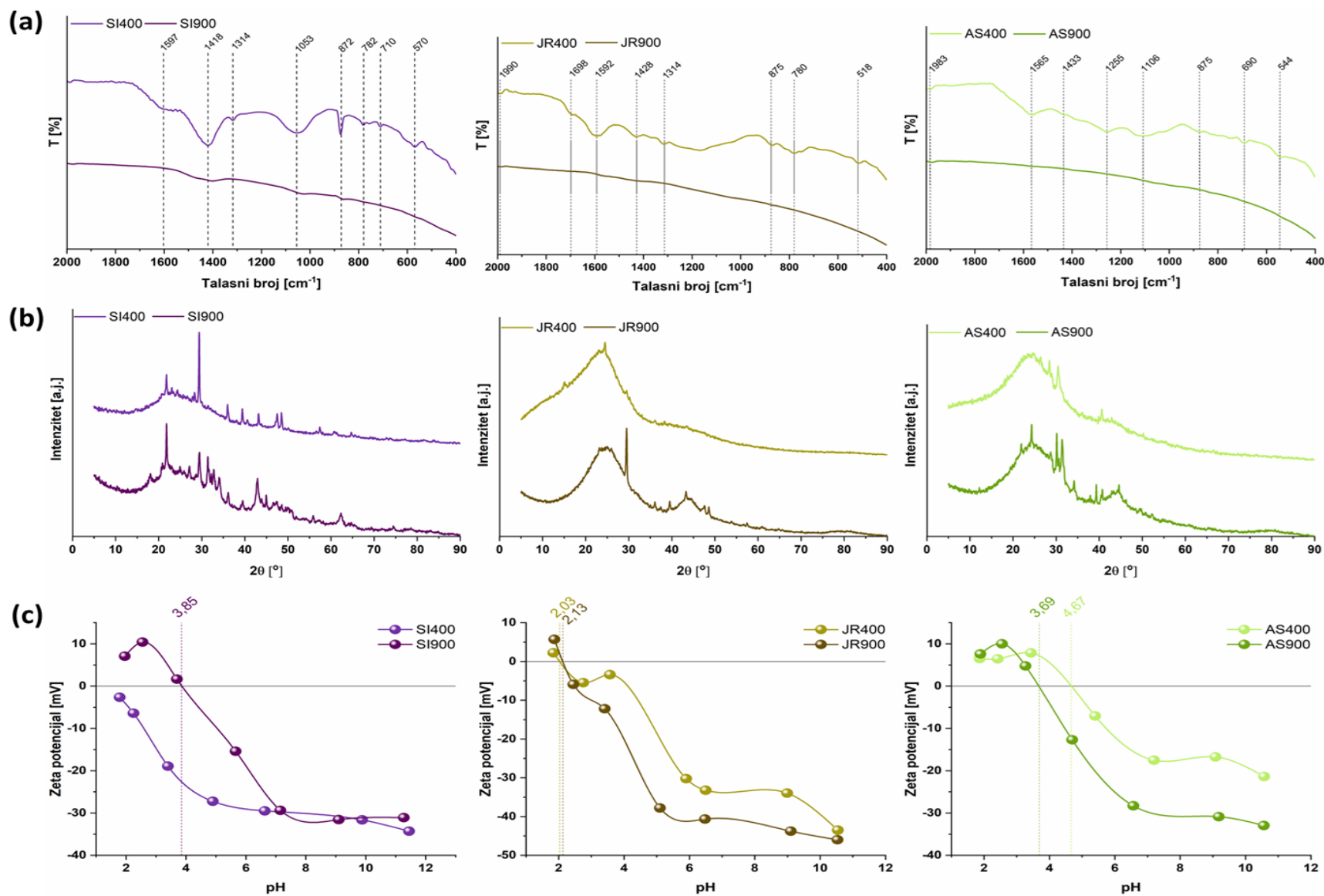
Površinska naelektrisanja materijala ispitana su merenjem zeta potencijala u funkciji pH vrednosti. Svi uzorci pokazuju tipično pH-zavisno ponašanje, pri čemu su pri niskim pH vrednostima površine pozitivno ili blago negativno naelektrisane, dok se sa porastom pH vrednosti zeta potencijal pomera ka negativnim vrednostima.

Kod SI materijala uočava se jasna razlika između uzoraka dobijenih na različitim temperaturama. SI900 ima izoelektričnu tačku na $\text{pH} = 3,85$, što ukazuje da je njegova površina negativno naelektrisana u većem delu ispitivanog pH opsega, čime se favorizuje adsorpcija katjonskih boja putem elektrostatičkih interakcija. Nasuprot tome, za SI400 izoelektrična tačka nije dostignuta ni pri najnižim pH vrednostima, što se može pripisati njegovoj izraženoj amorfности i heterogenoj raspodeli površinskih funkcionalnih grupa. Takođe, SI900 pokazuje konzistentno negativnije vrednosti zeta potencijala, što, u kombinaciji sa uređenijom strukturom, ukazuje na veću gustinu dostupnih aktivnih mesta i veći potencijal za interakcije sa adsorbatom. Ove razlike odražavaju uticaj temperature karbonizacije, koja dovodi do smanjenja sadržaja kiseoničnih funkcionalnih grupa i promene površinskog naelektrisanja, uz istovremeni razvoj delimično grafitizovane strukture.

Sličan trend primećen je kod JR materijala, Uzorci pokazuju pozitivano naelektrisanje u jako kiselim uslovima, dok sa porastom pH vrednosti dolazi do progresivnog opadanja zeta potencijala. Izoelektrične tačke iznose približno $\text{pH} 2,13$ za JR400 i $2,78$ za JR900, Iznad ovih vrednosti površina postaje negativno naelektrisana usled deprotonacije funkcionalnih grupa koje sadrže kiseonik, pre svega karboksilnih i fenolnih grupa.

AS materijali pokazuju analogno ponašanje, sa izoelektričnim tačkama na približno $\text{pH} 3,69$ za AS400 i $4,67$ za AS900. Porast negativnog naelektrisanja sa povećanjem pH ukazuje na dominaciju deprotonovanih površinskih funkcionalnosti u neutralnim i alkalnim uslovima. Uopšteno, ovakvo ponašanje zeta potencijala potvrđuje značaj površinske hemije u određivanju adsorpcionih svojstava, posebno u sistemima gde elektrostatičke interakcije imaju ključnu ulogu.

Ukupno posmatrano, promene u zeta potencijalu sa temperaturom karbonizacije i pH vrednošću ukazuju na međusobno uslovljenu evoluciju površinske hemije i strukture materijala, što direktno utiče na njihovu adsorpcionu efikasnost.



Slika 16. (a) FTIR spektri ($2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) za ispitivane ugljenične materijale; (b) XRD difraktogrami za ispitivane ugljenične materijale; (c) Zavisnost zeta potencijala od pH vrednosti za sve materijale sa označenim izoelektričnim tačkama

5.4. Adsorpcija katjonskih boja na sintetisane materijale

5.4.1. Ispitivanje uslova adsorpcije

S obzirom na to da pH vrednost rastvora predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji utiču na adsorpcioni proces, njeno dejstvo je najpre ispitano u širokom pH opsegu kako bi se odredili najpovoljniji uslovi za dalje eksperimente. Pored identifikacije optimalne pH vrednosti, ova ispitivanja omogućavaju i bolje razumevanje mehanizama adsorpcije kroz analizu promena efikasnosti uklanjanja boja u zavisnosti od naelektrisanja adsorbensa i adsorbata. Nakon određivanja optimalnog pH, ispitan je i uticaj količine adsorbensa i temperature na efikasnost uklanjanja boja, sa ciljem definisanja uslova koji obezbeđuju maksimalne adsorpcione performanse i predstavljaju osnovu za dalja kinetička i ravnotežna adsorpciona ispitivanja.

Efikasnost uklanjanja katjonskih boja ispitivana je u funkciji pH vrednosti (3-11) za sve ugljenične materijale, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 17 (a-d). Uočava se da pH vrednost značajno utiče na adsorpcione performanse, pri čemu intenzitet efikasnosti uklanjanja zavisi od prekursora, temperature karbonizacije i boje.

U slučaju adsorpcije MB (Slika 17a), materijali dobijeni na 900 °C (SI900, JR900 i AS900) postižu gotovo potpuno uklanjanje (~90-100%) nezavisno od pH vrednosti. Nasuprot tome, JR400 i AS400 pokazuju znatno nižu efikasnost, što se može dovesti u vezu sa slabije razvijenom poroznom strukturom i manjim brojem aktivnih mesta. Zanimljivo, SI400, uprkos nižoj temperaturi karbonizacije, ostvaruje visoke vrednosti uklanjanja, uporedive sa materijalima dobijenim na 900 °C, što ukazuje na povoljne strukturne i površinske karakteristike. Ovakvo ponašanje sugerise da je adsorpcija MB vođena jakim interakcijama koje nisu značajno osetljive na promene pH, poput π - π interakcija i elektrostatičkog privlačenja.

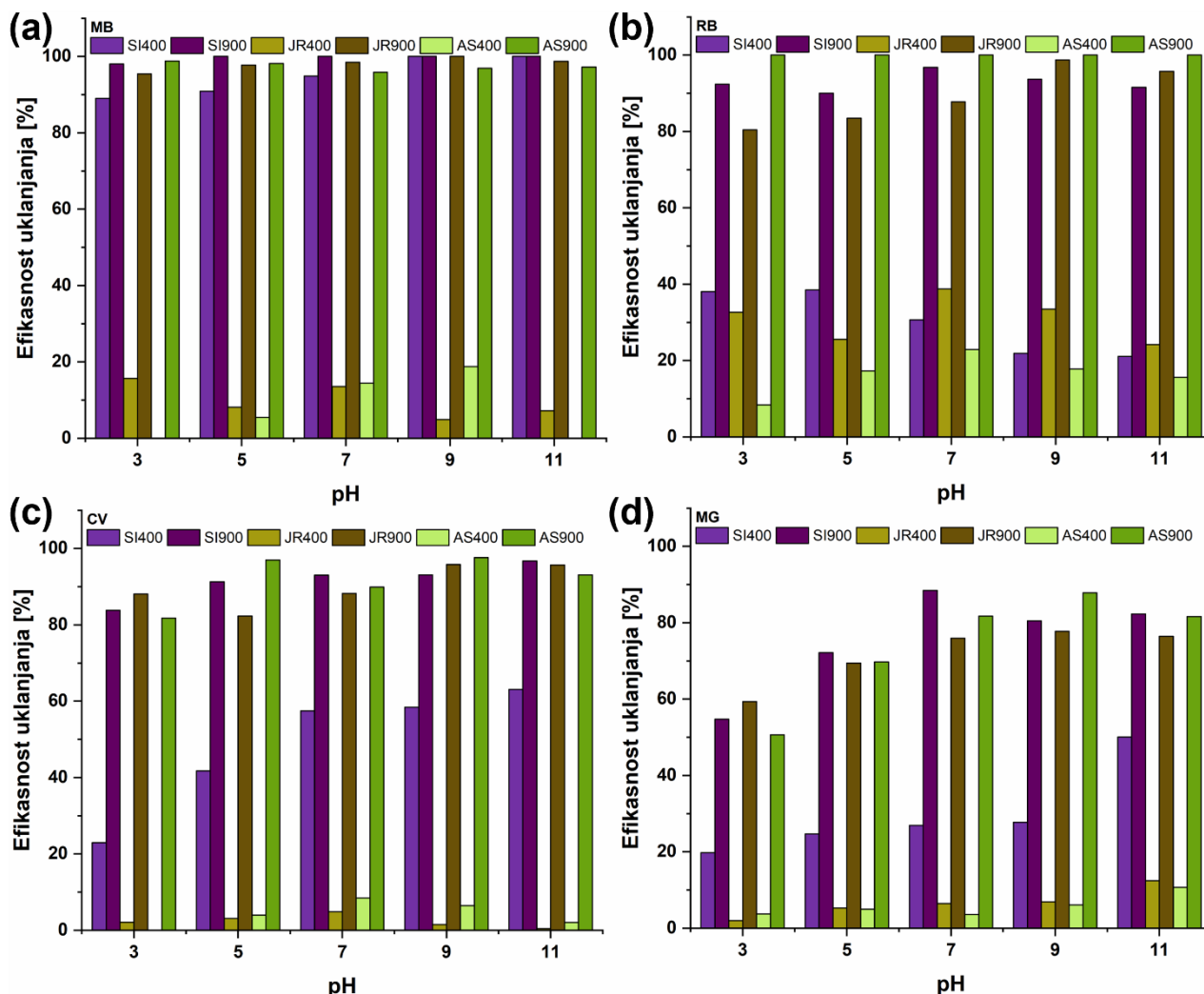
Pri adsorpciji RB (Slika 17b) AS900 pokazuje gotovo potpuno uklanjanje (~100%) u celom pH opsegu, dok SI900 i JR900 ostvaruju visoke i međusobno slične vrednosti. Materijali karbonisani na 400 °C ispoljavaju izraženiju zavisnost od pH: AS400 i JR400 postižu nešto bolju efikasnost nego u slučaju MB, dok SI400 pokazuje niže vrednosti koje opadaju sa porastom pH, Ovakvi rezultati ukazuju na značaj elektrostatičkih interakcija, ali i na izražen uticaj strukturnih karakteristika materijala.

Sličan trend primećen je i kod CV (Slika 17c), gde materijali tretirani na višim temperaturama (SI900, JR900 i AS900) pokazuju visoku i stabilnu efikasnost uklanjanja (~90–100%) u celom pH opsegu. Materijal SI400 pokazuje značajan porast efikasnosti sa povećanjem pH, što dodatno potvrđuje značaj elektrostatičkih interakcija u procesu adsorpcije. Sa druge strane, materijali JR400 i AS400 pokazuju veoma nisku efikasnost, nezavisno od pH, što ukazuje na ograničen adsorpcioni kapacitet ovih uzoraka.

Efikasnost uklanjanja pri adsorpciji MG (Slika 17d) je generalno niža u poređenju sa ostalim bojama, ali se jasno uočava trend povećanja sa porastom pH. Najniže vrednosti zabeležene su pri pH 3, dok se maksimum postiže u neutralnim i blago alkalnim uslovima. Materijali SI900 i AS900 pokazuju najbolje performanse, dok SI400, JR400 i AS400 imaju ograničenu efikasnost. Ovakvo ponašanje može se pripisati kombinaciji elektrostatičkih interakcija i kompeticije protona pri niskim pH vrednostima, kao i specifičnostima strukture MG molekula.

Uopšteno posmatrano, povećanje pH vrednosti dovodi do porasta efikasnosti adsorpcije za većinu sistema, što je u skladu sa rezultatima zeta potencijala koji ukazuju na sve negativnije naelektrisanje površine adsorbenata pri višim pH vrednostima. Ovo pogoduje jačanju elektrostatičkog privlačenja između adsorbenta i katjonskih boja. Međutim, maksimalna efikasnost uklanjanja za većinu sistema postiže se pri pH $\approx$ 7, nakon čega dolazi do blagog zasićenja ili smanjenja efikasnosti, dok MB pokazuje minimalnu zavisnost od pH.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da karbonizacija na 900 °C značajno poboljšava adsorpcione performanse materijala, usled razvoja porozne strukture i povećanja specifične površine, kao i formiranja većeg broja aktivnih mesta. Istovremeno, neutralni pH uslovi predstavljaju optimalan kompromis između efikasnosti uklanjanja i praktične primene, budući da odgovaraju uslovima koji se najčešće sreću u realnim vodenim sistemima i ne zahtevaju dodatno hemijsko podešavanje sistema.



Slika 17. Zavisnost efikasnosti uklanjanja: (a) MB, (b) RB, (c) CV i (d) MG adsorpcijom na ispitivane materijale od pH

Takođe, ispitivana je efikasnost uklanjanja boja adsorpcijom na dobijene ugljenične materijale u zavisnosti od temperature u temperaturnom opsegu 25-40 °C. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 18 (a-d). Analizom dobijenih podataka može da se zaključi da promena temperature ima relativno ograničen uticaj na tok adsorpcionog procesa.

SI900, JR900 i AS900 pokazuju gotovo potpuno temperaturno nezavisno ponašanje uz visoku efikasnost uklanjanja MB (Slika 18a), kao i SI400, uz blago povećanje u intervalu 25-35 °C, koje ne menja osnovni temperaturno nezavisni trend. Nasuprot tome, JR400 i AS400 ostvaruju nisku efikasnost uklanjanja (ispod 20%).

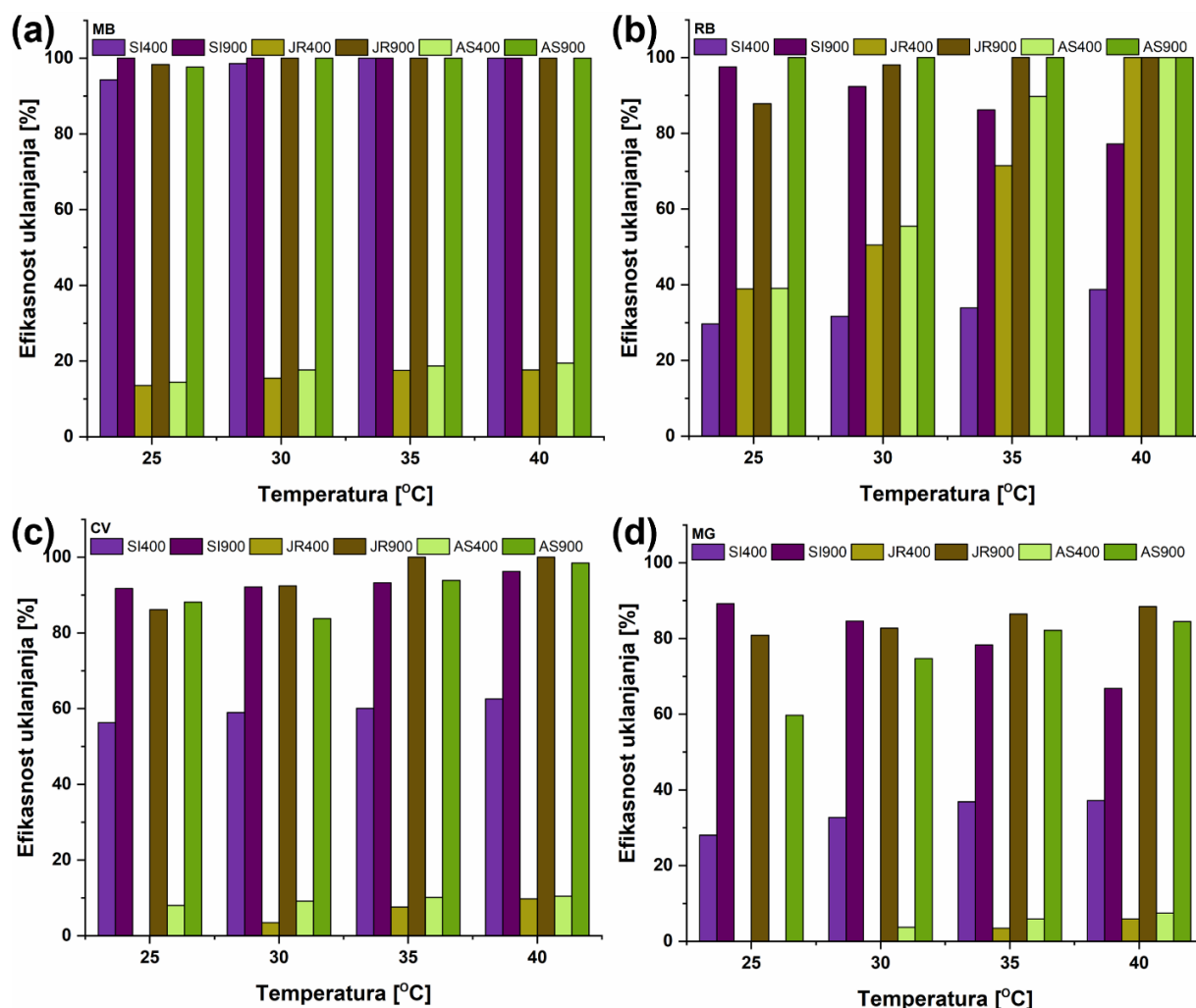
Pri adsorpciji RB (Slika 18b), SI900, JR900 i AS900 takođe pokazuju visoku i temperaturno nezavisnu efikasnost uklanjanja, dok JR400 ispoljava izraženu temperaturnu zavisnost, pri čemu se uočava poboljšanje efikasnosti uklanjanja sa porastom temperature. U poređenju sa MB, JR400 pokazuje

nešto bolju adsorpcionu sposobnost prema RB, dok SI400 pokazuje značajno nižu efikasnost uklanjanja u odnosu na MB, što ukazuje na izraženiju selektivnost ovog materijala prema ispitivanim bojama.

Materijali karbonizovani na 900 °C ispoljavaju visoku efikasnost uklanjanja pri adsorpciji CV (Slika 18c), približno 90-100%, uz blagi porast efikasnosti u intervalu 25–35 °C, nakon čega nema značajnih promena. SI400 pokazuje umerenu efikasnost uklanjanja, koja se nalazi između vrednosti zabeleženih za MB i RB, pri čemu je proces praktično nezavisan od temperature. Nasuprot tome, JR400 i AS400 ispoljavaju nisku efikasnost uklanjanja, bez značajnog uticaja temperature.

Na poslednjem grafiku (MG, Slika 18d), SI900 pokazuje blagi pad efikasnosti sa porastom temperature, što ukazuje na delimično egzoterman karakter adsorpcionog procesa. JR900 i AS900, s druge strane, ispoljavaju blagi porast efikasnosti u istom temperaturnom opsegu, dok AS400 i JR400 pokazuju generalno nisku efikasnost uklanjanja.

Posmatrano u celini, SI900, JR900 i AS900 predstavljaju materijale sa visokom i temperaturno nezavisnom adsorpcionom efikasnošću za sve ispitivane boje. SI400 pokazuje umerenu do visoku efikasnost u zavisnosti od boje, ali bez izražene temperaturne zavisnosti, dok JR400 i AS400 ispoljavaju najniže vrednosti uklanjanja, uz povremenu temperaturnu osetljivost. Dobijeni rezultati ukazuju da je efikasnost adsorpcije primarno uslovljena strukturnim karakteristikama materijala i vrstom boje, dok je uticaj temperature u ispitivanom opsegu sekundaran.



Slika 18. Zavisnost efikasnosti uklanjanja: (a) MB, (b) RB, (c) CV i (d) MG adsorpcijom na ispitivane materijale od temperature

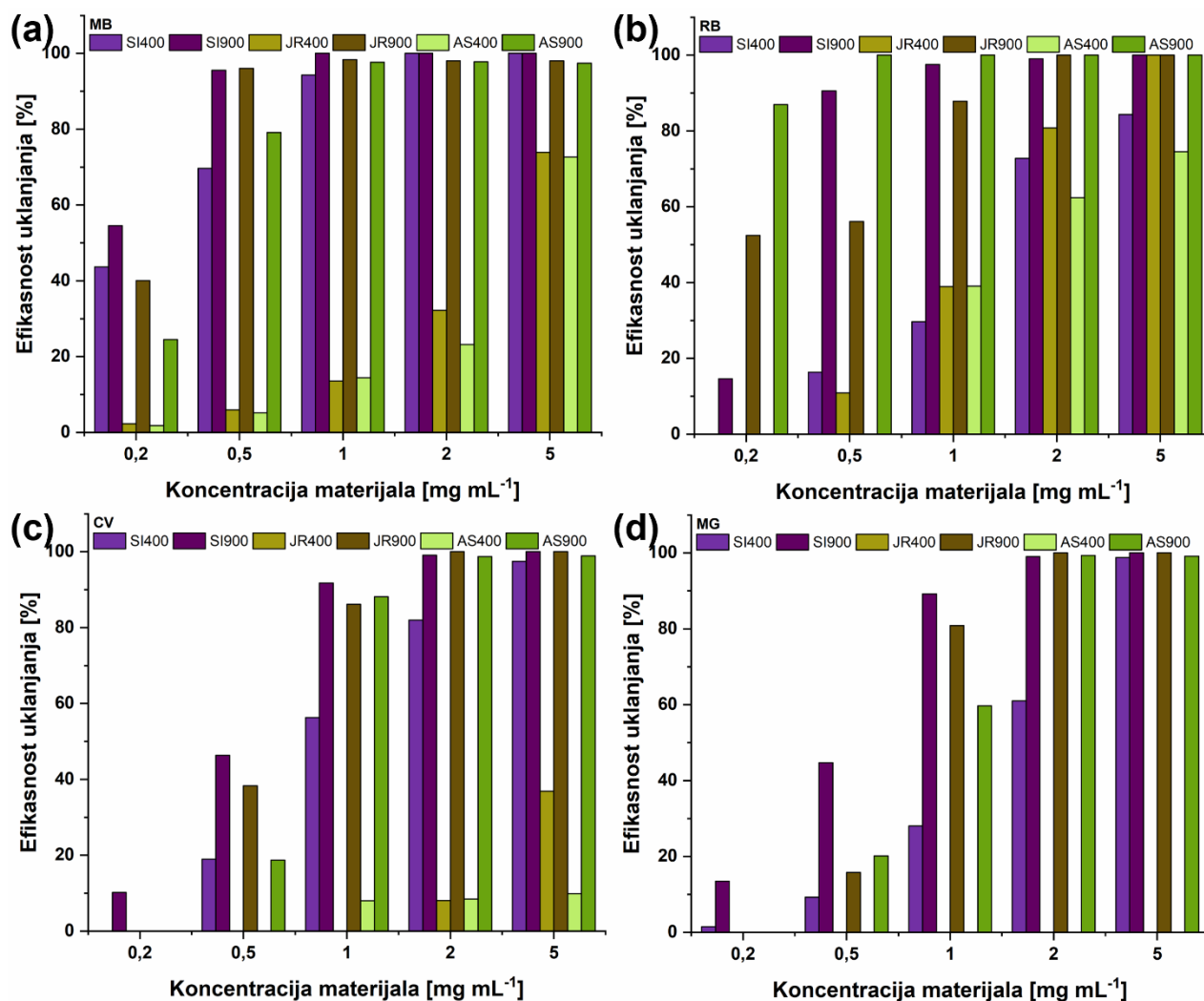
Zavisnost efikasnosti uklanjanja boja od koncentracije adsorbenta za ispitivane ugljenične materijale prikazana je na Slici 19 (a-d). U svim slučajevima uočava se jasan trend porasta efikasnosti sa povećanjem koncentracije materijala, što se može pripisati većem broju dostupnih aktivnih mesta za adsorpciju. Ipak, intenzitet ovog efekta značajno zavisi od strukturnih karakteristika adsorbenata.

Materijali dobijeni na 400 °C (SI400, JR400 i AS400) generalno pokazuju nisku efikasnost uklanjanja u celom ispitivanom opsegu koncentracija, posebno pri nižim koncentracijama materijala. Ovakvo ponašanje je u skladu sa njihovom slabo razvijenom poroznom strukturom i malom specifičnom površinom, što ograničava broj dostupnih adsorpcionih mesta. Izuzetak je SI400, koji pokazuje povećanje efikasnosti sa porastom koncentracije, pri čemu se može uočiti selektivnost prema bojama, sa izraženijim afinitetom prema MB u odnosu na ostale ispitivane boje (redosled: MB > CV > RB ≈ MG). Ovo ukazuje na značaj hemijske prirode boje i površinskih funkcionalnih grupa adsorbenta u procesu adsorpcije.

Nasuprot tome, materijali dobijeni na 900 °C (SI900, JR900 i AS900) ispoljavaju značajno višu adsorpcionu efikasnost već pri niskim koncentracijama adsorbenta. Kod uzoraka JR900 i AS900, gotovo potpuno uklanjanje svih ispitivanih boja postiže se već pri koncentracijama od 1–2 mg mL⁻¹, što ukazuje na visoku dostupnost aktivnih mesta i dobro razvijenu poroznu strukturu. Dalje povećanje koncentracije ne dovodi do značajnog poboljšanja efikasnosti, što sugerise da dolazi do zasićenja aktivnih mesta.

Takođe isti trend, primećen je i kod materijala SI900, koji pokazuje izuzetno visoku efikasnost uklanjanja za sve boje. Već pri koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ postiže se gotovo potpuno uklanjanje, bez značajnog povećanja pri višim dozama adsorbenta. Ovakvo ponašanje ukazuje na visok adsorpcioni kapacitet i brzu kinetiku adsorpcije, što se može dovesti u vezu sa razvijenom mikro/mezoporoznom strukturom i povoljnim površinskim karakteristikama.

Na osnovu dobijenih rezultata, koncentracija adsorbenta od 1 mg mL⁻¹ može se smatrati optimalnom, jer obezbeđuje visok stepen uklanjanja uz racionalnu potrošnju materijala. Ukupno posmatrano, SI900, JR900 i AS900 se izdvajaju kao visoko efikasni adsorbenti, pri čemu SI900 pokazuje najizraženiju kombinaciju efikasnosti i stabilnosti. Rezultati jasno ukazuju da su adsorpciona svojstva dominantno određena strukturnim i teksturalnim karakteristikama materijala, dok povećanje koncentracije adsorbenta ima sekundarni, ali i dalje značajan uticaj kroz povećanje broja dostupnih aktivnih mesta.



Slika 19. Zavisnost efikasnosti uklanjanja: (a) MB, (b) RB, (c) CV i (d) MG na ispitivanim materijalima od koncentracije materijala

Na osnovu izoženih rezultata odabrani su najoptimalniji uslovi za dalji tok istraživanja. Temperatura od 25 °C izabrana je kao optimalna jer su rezultati pokazali da promene temperature u opsegu 25-40 °C imaju minimalan ili zanemarljiv uticaj na adsorpcione performanse većine Sistema. S obzirom na to da nije uočen značajan porast efikasnosti pri višim temperaturama, odabrana je sobna temperatura kao energetski najpovoljniji i praktično najrelevantniji uslov, koji istovremeno odražava realne uslove primene u prirodnim i tehnološkim sistemima. Koncentracija adsorbenta od 1 mg mL⁻¹ odabrana je kao optimalna na osnovu rezultata koji pokazuju da se pri toj vrednosti postiže visok, često i gotovo potpuni stepen uklanjanja boja za materijale sa boljim performansama. Dalje povećanje koncentracije ne dovodi do značajnog poboljšanja efikasnosti, što ukazuje na zasićenje aktivnih mesta, te bi veće doze predstavljale nepotrebno povećanje potrošnje materijala bez proporcionalne koristi. Neutralna vrednost pH = 7 izabrana je kao optimalna jer se u tom opsegu postiže visok stepen uklanjanja za većinu ispitivanih sistema, dok istovremeno predstavlja i najpraktičniji uslov za primenu u realnim vodnim sredinama.

Na osnovu poređenja materijala, za dalju analizu i optimizaciju procesa odabrani su materijali SI400, SI900, JR900 i AS900, koji pokrivaju različite strukturne i termičke uslove pripreme. SI400 omogućava uvid u ponašanje materijala sa nižim stepenom karbonizacije, dok SI900 predstavlja

optimizovan SI-bazirani adsorbent sa visokim performansama. JR900 i AS900 se izdvajaju kao materijali sa izrazito visokom efikasnošću uklanjanja i stabilnim ponašanjem, što ih čini pogodnim za poređenje uticaja različitih prekursora pri istom stepenu termičke obrade.

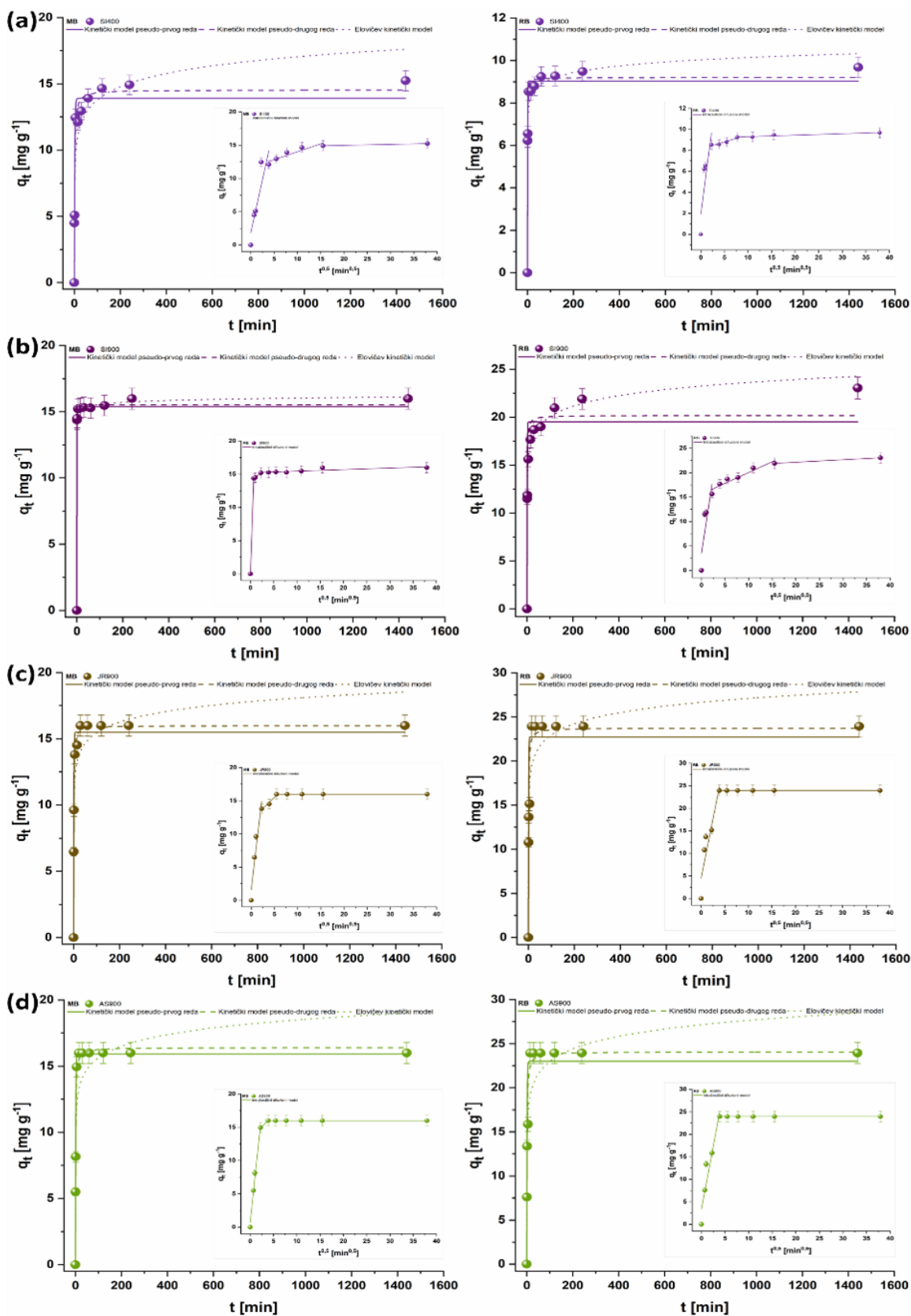
Sveukupno, izbor uslova 25 °C, pH 7 i 1 mg mL⁻¹, kao i odabir materijala SI400, SI900, JR900 i AS900, zasniva se na kombinaciji visoke adsorpcione efikasnosti, stabilnosti procesa i praktične primenljivosti, uz minimizaciju potrošnje energije i materijala. Ovakav pristup omogućava realnu procenu performansi adsorbenata i njihovo poređenje u uslovima koji su najbliži potencijalnoj primeni u tretmanu otpadnih voda.

5.4.2. Ispitivanje kinetike adsorpcije katjonskih boja na izabrane materijale

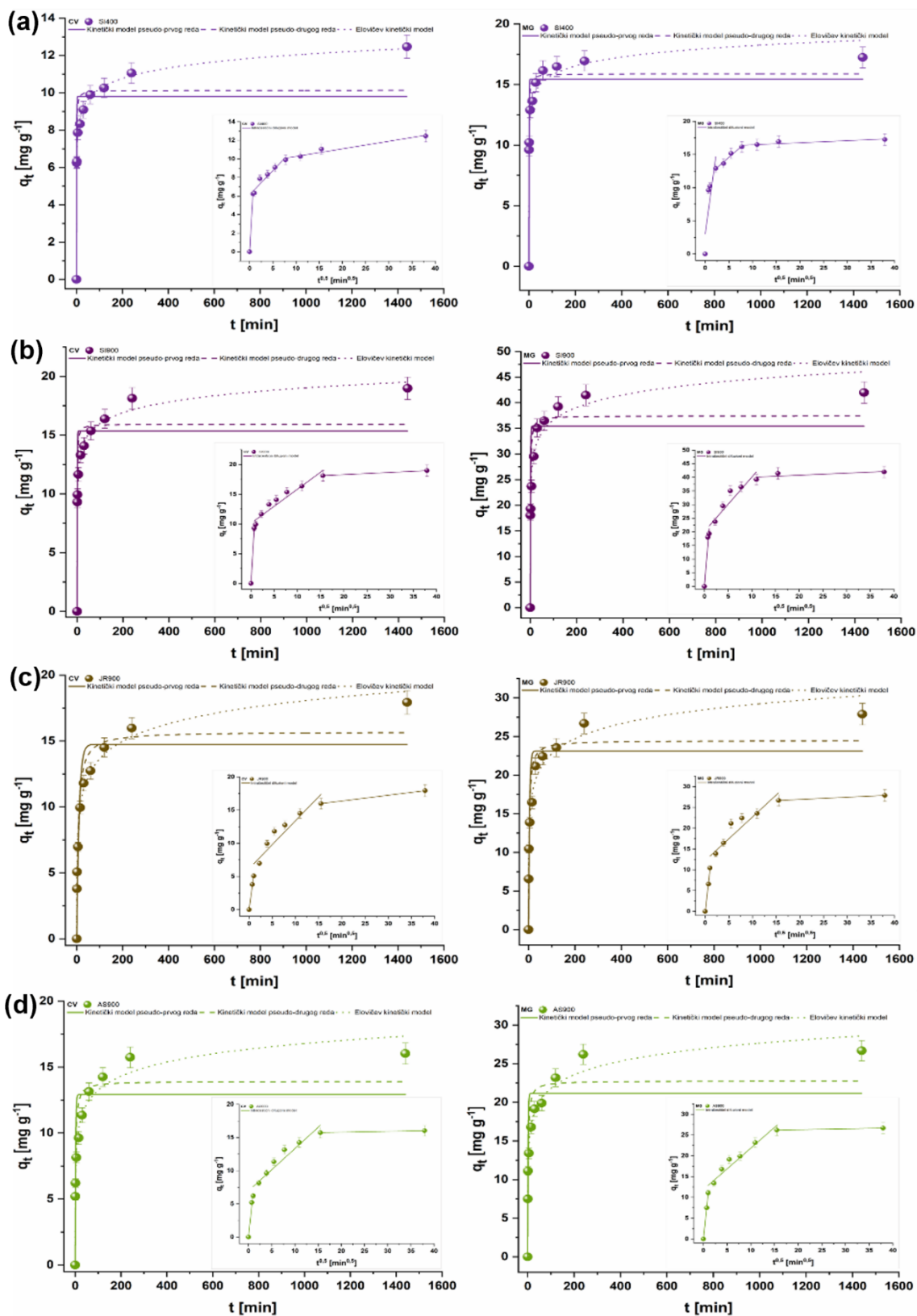
Kinetika adsorpcije ispitivanih katjonskih boja na odabranim materijalima analizirana je pri početnoj koncentraciji od 5×10^{-5} mol dm⁻³ primenom PFO, PSO, Elovichevog modela i IPD modela. Grafički prikaz zavisnosti q_t od vremenam kao i fitovanje eksperimentalnih podataka ispitivanim kinetičkim modelima je prikazano na Slikama 20 i 21. Dijagrami IPD modela prikazani su kao inserti unutar odgovarajućih kinetičkih krivih, čime je omogućena direktna vizuelna identifikacija višestepenog karaktera procesa. Dobijeni kinetički parametri za sve primenjene modele sumirani su u Tabelama 19 i 20, što omogućava kvantitativno poređenje različitih sistema i detaljniju interpretaciju mehanizma adsorpcije u funkciji strukturnih svojstava materijala i molekulske veličine adsorbata.

U svim ispitivanim sistemima PSO pokazuje bolje slaganje sa eksperimentalnim podacima u poređenju sa PFO, što je potvrđeno višim vrednostima R^2 i nižim vrednostima χ^2 . Istovremeno, vrednosti ravnotežnog adsorpcionog kapaciteta (q_e) dobijene iz oba modela su međusobno vrlo slične i u dobroj saglasnosti sa eksperimentalnim vrednostima (MB 15-16 mg g⁻¹, za RB 20-24 mg g⁻¹), što ukazuje da oba modela adekvatno procenjuju ravnotežno stanje, dok PSO bolje opisuje kinetički tok procesa. Ovaj rezultat treba posmatrati kao matematičku aproksimaciju, bez direktnog povezivanja sa specifičnim mehanizmom vezivanja.

Uticaj temperature karbonizacije na kinetiku adsorpcije je izrazito značajan i dovodi do fundamentalne promene u brzini i režimu procesa. Kod materijala SI400 adsorpcija MB, RB i MG dostiže ravnotežu za približno 4 h, dok CV zahteva znatno duže vreme (do 24 h), što ukazuje na izražen uticaj difuzionih ograničenja. Nasuprot tome, kod materijala karbonizovanih na 900 °C dolazi do značajnog ubrzanja adsorpcije, pri čemu se najveći deo procesa odvija u prвих 20-40 minuta, a ravnoteža se praktično uspostavlja nakon oko 60 minuta za MB i RB. Ovo ubrzanje prati značajan porast konstanti brzine; na primer, za MB kod SI materijala k_2 raste sa 0,048 na 1,346 mg g⁻¹ min⁻¹, dok kod JR900 i AS900 dostiže još više vrednosti (do 8,81 i 6,66 mg g⁻¹ min⁻¹). Istovremeno, dolazi i do povećanja adsorpcionog kapaciteta (npr, RB: 9,20 - 20,2 mg g⁻¹; MG: 15,9 - 37 mg g⁻¹), što potvrđuje da viša temperatura karbonizacije unapređuje i kinetičke i kapacitivne performanse.



Slika 20. Eksperimentalne kinetičke krive adsorpcije MB i RB na ugljeničnim materijalima (a) SI400, (b) SI900, (c) JR900 i (d) AS900 i njihovo fitovanje odgovarajućim kinetičkim modelima



Slika 21. Eksperimentalne kinetičke krive adsorpcije CV i MG na ugljeničnim materijalima (a) SI400, (b) SI900, (c) JR900 i (d) AS900 i njihovo fitovanje odgovarajućim kinetičkim modelima

Tabela 19. Kinetički parametri za adsorpciju MB I RB (5×10^{-5} mol dm⁻³) na ispitivane materijale

Materijal	MB				RB			
	SI400	SI900	JR900	AS900	SI400	SI900	JR900	AS900
Kinetički model pseudo-prvog reda								
q_e (mg g ⁻¹)	13,9±0, 2	15,4±0, 1	15,5±0, 3	15,9±0, 1	9,03±0, 05	20±1	22±2	23,0±0, 1
k_1 (min ⁻¹)	0,522±0 ,005	5,187±0 ,008	1,00±0, 04	0,751±0 ,003	1,83±0, 03	1,3±0,1	1,01±0, 7	0,740±0 ,003
χ^2	1,218	0,183	0,611	0,091	0,368	6,205	8,487	6,319
R^2	0,958	0,992	0,979	0,997	0,957	0,868	0,876	0,915
Kinetički model pseudo-dugog reda								
q_e (mg g ⁻¹)	14,5±0, 2	15,53±0 ,02	15,98±0 ,03	16,4±0, 1	9,20±0, 04	20,2±0, 8	23,7±0, 4	24,1±0, 3
k_2 (mg min ⁻¹ g ⁻¹)	0,048±0 ,001	1,346±0 ,001	8,81±0, 01	6,66±0, 01	0,363±0 ,002	0,086±0 ,002	5,23±0, 04	3,82±0, 03
χ^2	0,726	0,092	0,109	0,260	0,143	3,624	4,297	2,693
R^2	0,975	0,996	0,996	0,992	0,983	0,923	0,937	0,964
Elovičev kinetički model								
α (mg g ⁻¹ min ⁻¹)	220±10	(1,306± 0,001) × 10 ³⁰	7900±3 00	3000±5 00	(2,87±0 ,03) × 10 ⁶	5290±1 0	5100±3 00	1500±2 00
β (g mg ⁻¹)	0,70±0, 03	4,853±0 ,001	0,87±0, 03	0,79±0, 05	2,22±0, 04	0,635±0 ,003	0,55±0, 02	0,49±0, 04
χ^2	3,091	0,028	3,133	5,735	0,220	0,477	7,761	10,274
R^2	0,892	0,999	0,895	0,830	0,974	0,990	0,886	0,862
Intračestični difuzioni model								
I segment								
C (mg g ⁻¹)	1,845	0,000	1,594	0,639	1,923	3,528	4,526	3,410
k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	3,190	20,333	5,965	6,607	3,455	6,312	5,235	5,598
R^2	0,766		0,874	0,980	0,642	0,639	0,803	0,867
II segment								
C (mg g ⁻¹)	11,640	13,966	12,163	13,505	8,140	15,617	23,951	23,951
k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	0,238	0,554	0,675	0,642	0,134	0,441	0,000	0,000
R^2	0,825	0,995	0,920		0,873	0,897	--	--
III segment								
C (mg g ⁻¹)	14,703	15,228	15,993	15,993	9,169	21,118	--	--
k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	0,014	0,023	0,000	0,000	0,014	0,051	--	--
R^2	--	0,656	1,000	1,000	0,848	--	--	--

Tabela 20. Kinetički parametri za adsorpciju CV I MG (5×10^{-5} mol dm⁻³) na ispitivane materijale

Materijal	CV				MG			
	SI400	SI900	JR900	AS900	SI400	SI900	JR900	AS900
Kinetički model pseudo-prvog reda								
q_e (mg g ⁻¹)	9,8±0,6	15±1	14,7±0,9	12±2	15,5±0,8	35±3	23±2	21±4
k_1 (min ⁻¹)	1,5±0,2	1,4±0,1	0,10±0,01	0,52±0,08	1,46±0,06	0,95±0,09	0,25±0,03	0,58±0,09
χ^2	2,263	5,814	5,880	6,632	2,77	35,93	15,94	17,00
R^2	0,813	0,809	0,824	0,751	0,900	0,798	0,810	0,766
Kinetički model pseudo-dugog reda								
q_e (mg g ⁻¹)	10±1	16±1	15,7±0,6	13,9±0,8	15,9±0,5	37±2	24,5±0,6	22,8±0,9
k_2 (mg min ⁻¹ g ⁻¹)	0,20±0,04	0,12±0,02	1,04±0,03	3,6±0,2	0,138±0,003	0,027±0,003	1,47±0,03	2,4±0,2
χ^2	1,591	3,985	3,271	3,754	1,50	20,32	8,19	9,79
R^2	0,869	0,869	0,902	0,859	0,946	0,886	0,902	0,865
Elovičev kinetički model								
α (mg g ⁻¹ min ⁻¹)	2494±9	2512±2	23,3±0,6	86±2	26400±200	1170±10	92±2	136±7
β (g mg ⁻¹)	1,238±0,002	0,760±0,002	0,520±0,003	0,652±0,004	0,932±0,005	0,284±0,006	0,355±0,006	0,394±0,004
χ^2	0,041	0,208	0,317	0,598	0,541	5,024	1,981	1,521
R^2	0,997	0,993	0,991	0,978	0,980	0,972	0,976	0,979
Intračestični difuzioni model								
I segment								
C (mg g ⁻¹)	0,000	0,000	0,039	0,148	3,054	0,809	-0,154	-0,066
k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	8,842	13,158	5,129	6,423	5,202	20,464	10,248	11,019
R^2	--	--	0,996	0,963	0,612	0,896	0,984	0,997
II segment								
C (mg g ⁻¹)	6,140	10,120	6,185	6,945	11,477	20,178	12,209	11,869
k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	0,520	0,573	0,722	0,639	0,619	1,991	1,052	0,997
R^2	0,928	0,911	0,861	0,903	0,963	0,853	0,844	0,932
III segment								
C (mg g ⁻¹)	9,454	17,554	14,640	15,532	16,152	39,259	25,858	25,872
k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	0,082	0,038	0,087	0,013	0,031	0,076	0,054	0,021
R^2	0,936	--	--	--	0,654	0,141	--	--

Ovakvo poboljšanje kinetike direktno je povezano sa razvojem porozne strukture, povećanjem specifične površine i prelaskom ka dominantno mikroporoznom karakteru. Ove promene omogućavaju veću dostupnost aktivnih mesta i efikasniji transport mase u početnim fazama adsorpcije, Međutim, ovaj efekat je snažno modulisan veličinom molekula adsorbata.

Manji molekuli, poput MB i RB, pokazuju brzu kinetiku i visoke vrednosti k_2 , uz dostizanje ravnoteže u relativno kratkom vremenskom intervalu (30–60 min), što ukazuje na efikasan transport kroz poroznu strukturu i minimalna difuziona ograničenja. Nasuprot tome, veći molekuli, kao što su CV i MG, pokazuju značajno sporiju kinetiku (niže k_2 , tipično $0,12 - 3,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i produženo vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže (do 24 h), što ukazuje na dominantan uticaj sternih ograničenja i otežanu difuziju unutar mikropora (približno 1–1,6 nm). Ovaj efekat je posebno izražen kod visoko karbonizovanih materijala, gde razvijena mikroporoznost, iako povećava kapacitet, može ograničiti pristup većim molekulima.

Dodatni uvid u početne faze adsorpcije pruža Elovichev model. Parametar α , koji predstavlja početnu brzinu adsorpcije, dostiže veoma visoke vrednosti kod SI materijala (reda $10^6 - 10^{30}$), što ukazuje na intenzivnu inicijalnu interakciju i prisustvo lako dostupnih površinskih mesta. Međutim, ova inicijalna prednost ne dovodi nužno do bržeg dostizanja ravnoteže, što potvrđuju niže vrednosti k_2 i izraženija difuziona ograničenja u kasnijim fazama. Nasuprot tome, JR900 i AS900 pokazuju umerenije vrednosti α , ali stabilniji i kontinuiran tok adsorpcije. Visoka vrednost parametra α i niska vrednost β ukazuju na brzu početnu adsorpciju i relativno sporo opadanje brzine adsorpcije sa vremenom, što sugerise visok afinitet adsorbenta prema adsorbatu i postojanje energetski povoljnih aktivnih mesta na heterogenoj površini.

Model intračestične difuzije potvrđuje da se adsorpcija odvija kroz više faza: brzu početnu adsorpciju na spoljašnjoj površini (visoke k_{id1} , do $20 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-0,5}$), zatim difuziju unutar pora (značajno niže vrednosti), i konačno fazu ravnoteže, gde k_{id3} teži nuli. Vrednosti C i njihova bliskost sa q_e potvrđuju da intračestična difuzija nije jedini ograničavajući korak, već da značajan doprinos imaju i difuzija kroz granični sloj i površinska adsorpcija. Uočeno je da RB i MG mogu pokazati visoke početne k_{id1} vrednosti, što ukazuje na efikasan početni transport, ali se ograničenja javljaju u kasnijim fazama zbog otežane difuzije u mikropore.

Posmatranjem svih kinetičkih parametara može se zaključiti da temperatura karbonizacije i veličina molekula adsorbata zajednički određuju brzinu adsorpcije. Povećanje temperature karbonizacije dovodi do povećanja dostupnosti aktivnih mesta i ubrzanja početne adsorpcije, ali istovremeno uvodi izraženija difuziona ograničenja za veće molekule usled razvoja mikroporozne strukture. Kao rezultat toga, materijali karbonizovani na 900°C pokazuju superiorne performanse za manje molekule i u sistemima gde je dostupno dovoljno vreme za difuziju, dok materijali sa izraženom početnom adsorpcijom mogu imati prednost u uslovima ograničenog vremena kontakta.

Radi obezbeđivanja uniformnosti i uporedivosti eksperimentalnih uslova, izotemska adsorpciona istraživanja biće sprovedena pri kontaktnom vremenu od 24 h.

5.4.3. Izotermne studije i mehanizmi adsorpcije katjonskih boja na izabranim ugljeničnim materijalima

Nakon analize kinetike, ravnotežno adsorpciono ponašanje dodatno je ispitano primenom Frojndlihovog, Langmirovog, Temkinovog i Dubinin–Raduškevičevog modela izoterma (Slika 22 i 23). Parametri izotermnih modela za adsorpciju boja na ispitivanim materijalima pri 25 °C prikazani su u Tabelama 21 i 22. U svim sistemima adsorpcioni kapacitet (q_e) raste sa povećanjem ravnotežne koncentracije (c_e), što ukazuje na povoljan karakter adsorpcije, ali i na to da se proces ne odvija kroz jedinstven mehanizam, već kroz kombinaciju interakcija čiji relativni doprinos zavisi od strukture adsorbenta i molekula boje.

Uticaj temperature karbonizacije se može videti kod SI materijala. Povećanje temperature sa 400 na 900 °C dovodi do višestrukog povećanja adsorpcionog kapaciteta, pri čemu se za MB uočava porast sa 153,5 na 226 mg g⁻¹, a za RB sa 78,9 na 130 mg g⁻¹. Ovaj porast nije linearan, već odražava prelaz iz sistema ograničenog dostupnošću površine ka sistemu u kojem dominantnu ulogu preuzima struktura pora. BET analiza pokazuje da se pri višoj temperaturi razvija značajna mikroporoznost, dok SEM i XRD rezultati ukazuju na reorganizaciju i formiranje delimično grafitizovane strukture. Ova kombinacija povećava broj aktivnih mesta, ali i menja njihovu prirodu, od funkcionalno definisanih mesta ka π -elektronski aktivnim domenima.

JR900 se izdvaja po najvišim kapacitetima za MB i RB (321 i 304 mg g⁻¹), što direktno odražava njegovu visoku specifičnu površinu i razvijenu mikroporoznu mrežu. Međutim, ovi visoki kapaciteti nisu posledica samo površine, već i raspodele pora i njihove pristupačnosti. AS900, iako ima nižu specifičnu površinu, pokazuje relativno visoke kapacitete (217 i 210 mg g⁻¹), što ukazuje da optimalna adsorpcija ne zavisi isključivo od ukupne površine, već i od njene efektivne dostupnosti.

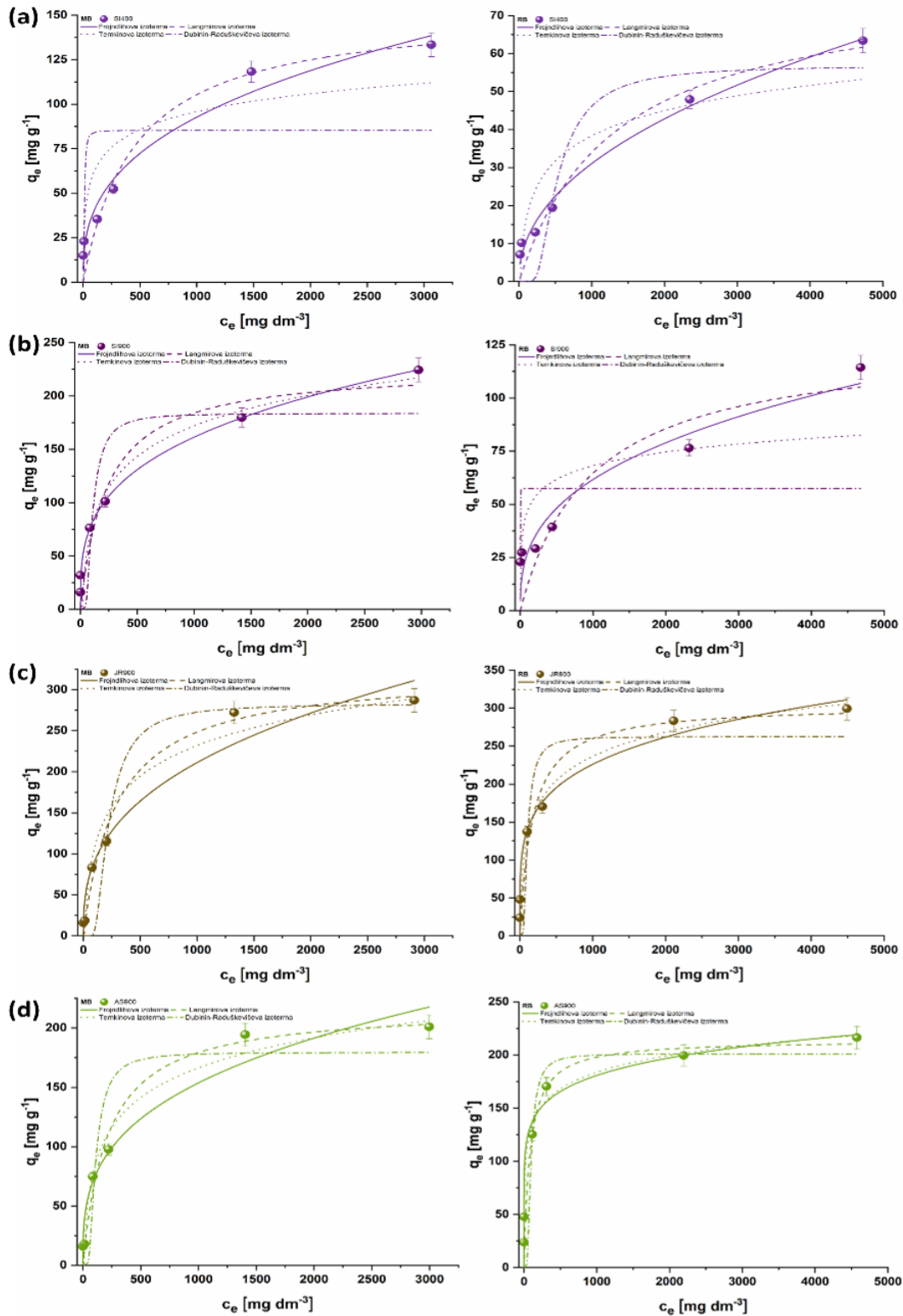
Frojndlihov model dosledno daje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima (R^2 je približno 0,98), što potvrđuje da površina adsorbenata nije homogena. Ova heterogenost proizilazi iz kombinacije faktora: prisustva defekata, različitih tipova pora i delimične grafitizacije, što je potvrđeno XRD i FTIR analizom. Vrednosti konstante K_F rastu sa povećanjem temperature karbonizacije kod SI materijala, što ukazuje na povećanje ukupnog adsorpcionog potencijala. Istovremeno, visoke vrednosti eksponenta n ukazuju na izražen afinitet pri niskim pokrivenostima, što sugerise prisustvo visokoenergetskih mesta.

Langmirov model omogućava kvantifikaciju maksimalnog kapaciteta, ali njegova primenljivost zavisi od sistema. Za MB i RB model daje stabilne i fizički smislene rezultate, ali u slučaju CV i MG dolazi do značajnih odstupanja, uključujući ekstremno visoke vrednosti q_{max} (npr, MG na SI900 ~5040 mg g⁻¹). Ove vrednosti ne treba interpretirati kao realne kapacitete, već kao indikator da sistem odstupa od idealizovanog Langmirovog modela. U takvim slučajevima, adsorpcija verovatno uključuje višeslojno vezivanje, agregaciju molekula ili kombinaciju procesa. Ovakvo ponašanje je posebno zanimljivo kada se poveže sa veličinom molekula, CV i MG, kao voluminozniji molekuli, pokazuju veću sklonost ka odstupanju od modela, što je u skladu sa kinetičkim rezultatima koji su ukazali na izražena difuziona ograničenja. U sistemima sa dominantno uskim porama, pristup voluminoznijih molekula pojedinim delovima unutrašnje površine može biti ograničen njihovim efektivnim poprečnim presekom, konformacijom i mogućnošću odgovarajuće orijentacije pri ulasku u pore, što doprinosi neuniformnoj raspodeli adsorpcije i složenijem izotermnom ponašanju.

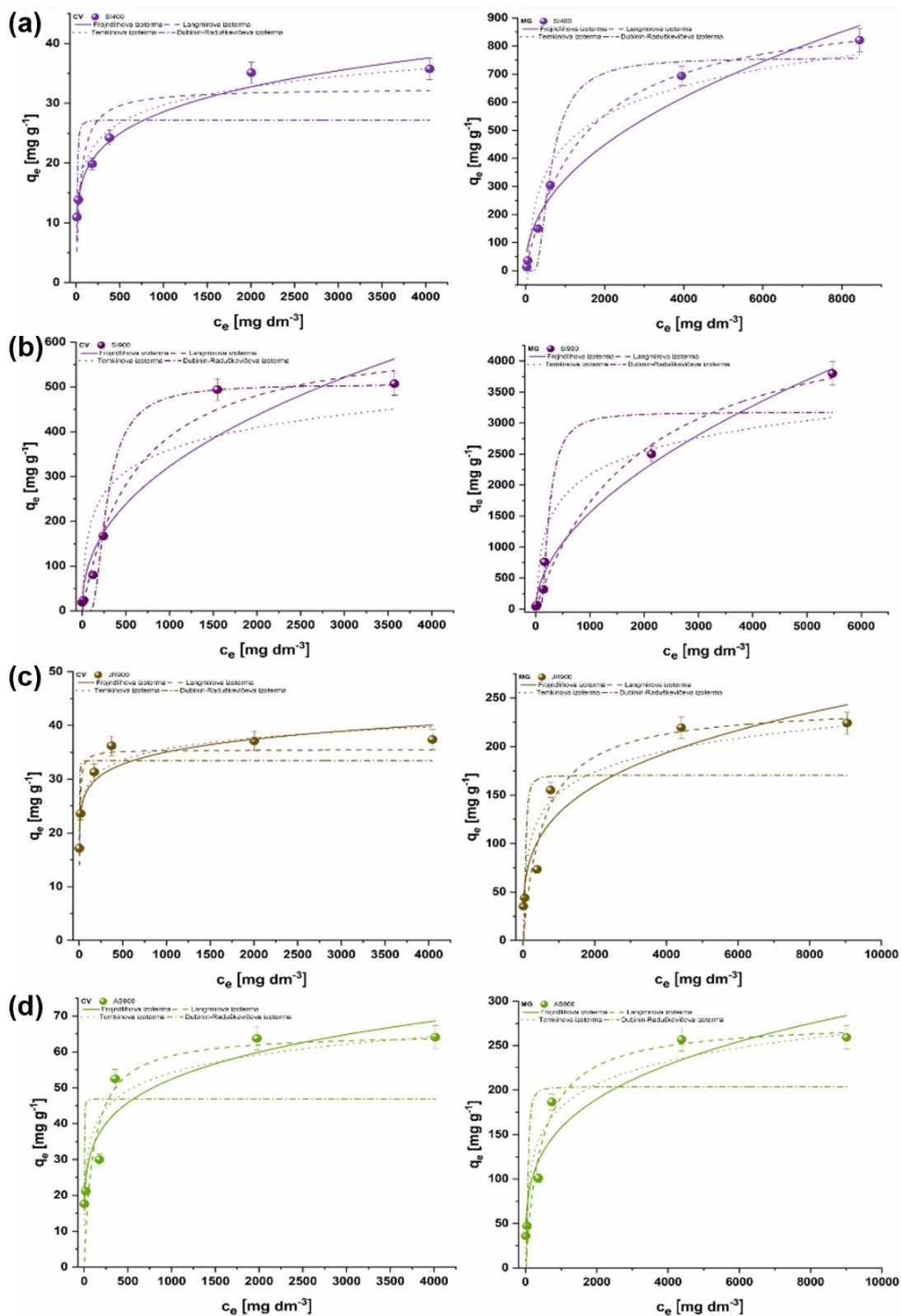
Temkinov model dodatno ukazuje na to da energija adsorpcije nije konstantna, već opada sa povećanjem pokrivenosti. Ovo se može povezati sa činjenicom da se u početnim fazama adsorpcije popunjavaju prisutni defekti, ivice i π -domeni, dok kasnije dolazi do adsorpcije na slabije aktivnim lokacijama ili čak do interakcija između adsorbovanih molekula. Ovaj efekat je naročito izražen kod RB i CV, gde π - π interakcije između aromatičnih sistema mogu doprineti stabilizaciji adsorbovanog sloja.

Dubinin–Raduškevičev model, iako slabije opisuje eksperimentalne podatke, pruža važan uvid u prirodu adsorpcije. Niske vrednosti energije adsorpcije ($<< 8$ kJ mol⁻¹) potvrđuju da je proces dominantno

fizičke prirode [205], što je u skladu sa svim prethodnim ispitivanjima i ukazuje da adsorpcija nije vođena formiranjem jakih hemijskih veza, već kombinacijom slabijih interakcija (elektrostatičkih, π - π i disperzionih sila).



Slika 22. Adsorpcione izoterme MB i RB na ugljeničnim materijalima (a) SI400, (b) SI900, (c) JR900 i (d) AS900 i njihovo fitovanje odgovarajućim modelima izoterme



Slika 23. Adsorpcione izoterme CV i MG na ugljeničnim materijalima (a) SI400, (b) SI900, (c) JR900 i (d) AS900 i njihovo fitovanje odgovarajućim modelima izoterma.

Tabela 21. Parametri izoterma za adsorpciju MB i RB na ispitivane materijale na 25 °C

Materijal	MB				RB			
	SI400	SI900	JR900	AS900	SI400	SI900	JR900	AS900
Froindlihov model								
K_F $((\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})^{1/n})$	7,78±0,04	19,9±0,3	17,2±0,3	17,2±0,4	1,25±0,0	5,2±0,4	52,1±0,7	75±3
n	2,79±0,04	3,30±0,05	2,76±0,05	3,16±0,05	2,15±0,03	2,8±0,3	4,71±0,06	7,9±0,2
χ^2	88,6	319,9	737,3	392,6	8	158	844	809
R^2	0,965	0,953	0,949	0,941	0,985	0,881	0,936	0,873
Langmirov model								
K_L $(\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})$	(2,19±0,02) × 10 ⁻³	(4,35±0,05) × 10 ⁻³	(3,39±0,02) × 10 ⁻³	(4,71±0,03) × 10 ⁻³	(7,56±0,06) × 10 ⁻⁴	(1,0±0,1) × 10 ⁻³	(5,85±0,05) × 10 ⁻³	(12,4±0,7) × 10 ⁻³
$q_{\max}$ (mg g^{-1})	153,5±0,6	226±1	321±4	217±4	78,9±0,5	130±3	304±7	210±10
χ^2	162	512	233	161	28	356	1029	738
R^2	0,937	0,924	0,984	0,976	0,947	0,732	0,922	0,884
Temkinov model								
K_T $(\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})$	0,74±0,08	(6,42±0,05) × 10 ⁻²	0,0752±0,0001	0,102±0,005	(5,5±0,3) × 10 ⁻²	1,6±0,7	0,171±0,005	3,3±0,2
b_T $(\text{J g mol}^{-1} \text{ mg}^{-1})$	170±20	60,0±0,4	46,1±0,4	68,3±0,5	260±10	300±100	53,8±0,8	110±20
χ^2	675	372	577	192	109	606	810	784
R^2	0,736	0,945	0,960	0,971	0,798	0,543	0,939	0,877
Dubinin-Raduškevičev model								
q_{DR} (mg g^{-1})	90±50	180±20	280±40	180±30	57±5	60±40	260±40	200±30
K_{DR} $(\text{mol}^2 \text{ J}^{-2})$	(2±1) × 10 ⁻⁵	(1,4±0,6) × 10 ⁻³	(6,0±0,2) × 10 ⁻³	(1,4±0,1) × 10 ⁻³	(3,4±0,5) × 10 ⁻²	(4±3) × 10 ⁻⁷	(1,31±0,1) × 10 ⁻³	(1,1±0,1) × 10 ⁻³
E (J mol^{-1})	200±100	19±5	9,2±0,7	20±4	4±1	1200±500	19±4	22±4
χ^2	1783	1546	1876	1118	99	1408	2488	853
R^2	0,303	0,772	0,871	0,833	0,816	0,300	0,812	0,866

Tabela 22. Parametri izoterma za adsorpciju CV i MG na ispitivane materijale na 25 °C

Materijal	CV				MG			
	SI400	SI900	JR900	AS900	SI400	SI900	JR900	AS900
Froindlijev model								
K_F $((\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})^{1/n})$	7,35±0,03	15,7±0,6	18,1±0,9	13,7±0,7	13,3±0,2	37,8±0,3	19,0±0,7	24,9±0,8
n	5,09±0,03	2,29±0,05	10,5±0,5	5,1±0,2	2,16±0,04	1,86±0,02	3,57±0,06	3,7±0,2
χ^2	2,50	4327,12	9,69	48,55	4545	36790	697	943
R^2	0,977	0,916	0,862	0,892	0,962	0,985	0,906	0,907
Langmirov model								
K_L $(\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})$	(2,05±0,08) × 10 ⁻²	(1,62±0,02) × 10 ⁻³	(200±30) × 10 ⁻³	(9±1) × 10 ⁻³	(6,847±0,001) × 10 ⁻⁴	(5,18±0,02) × 10 ⁻⁴	(1,76±0,04) × 10 ⁻³	(2,24±0,06) × 10 ⁻³
q_{max} (mg g^{-1})	32±2	628±1	35±3	65±9	959,0±0,1	5040±40	243±6	278±8
χ^2	29,38	971,89	10,75	123,83	202	40241	619	531
R^2	0,732	0,981	0,847	0,724	0,998	0,983	0,916	0,948
Temkinov model								
K_T $(\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1})$	0,909±0,004	0,16±0,06	168±8	1,8±0,1	(1,93±0,03) × 10 ⁻²	(5,4±0,4) × 10 ⁻²	0,12±0,01	0,133±0,006
b_T $(\text{J g mol}^{-1} \text{ mg}^{-1})$	568±5	35±8	838±9	340±30	16,4±0,6	4,6±0,6	78±2	66,4±0,9
χ^2	4,00	13641,40	5,39	61,49	7703	486864	942	877
R^2	0,964	0,736	0,923	0,863	0,935	0,798	0,873	0,913
Dubinin-Raduškevičev model								
q_{DR} (mg g^{-1})	30±20	505±5	30±10	50±20	759±6	3170±20	200±100	200±60
K_{DR} $(\text{mol}^2 \text{ J}^{-2})$	(2±1) × 10 ⁻⁵	(9,66±0,09) × 10 ⁻³	(0,0016±0,0006) × 10 ⁻³	(0,002±0,001) × 10 ⁻³	(4,92±0,04) × 10 ⁻²	(7,20±0,07) × 10 ⁻³	(0,6±0,1) × 10 ⁻³	(0,6±0,2) × 10 ⁻³
E (J mol^{-1})	200±100	7,19±0,03	600±200	500±200	3,19±0,04	8,33±0,06	30±10	30±10
χ^2	72,96	1469,20	29,72	373,87	5831	211455	3868	4252
R^2	0,335	0,972	0,576	0,166	0,951	0,912	0,477	0,580

Da bi se detaljnije sagledao uticaj geometrijskih karakteristika molekula boja na njihovu pristupačnost poroznoj strukturi adsorbenata, izračunate su geometrijske i približne van der Waalsove dimenzije katjona MB, RB, CV i MG i upoređene sa karakterističnim širinama pora materijala SI400, SI900, JR900 i AS900 određenim NLDFT analizom (Tabela 23).

Karakteristične širine pora iznose 9,63 nm za SI400, 1,92 nm za SI900, 1,18 nm za JR900 i 1,64 nm za AS900. Međutim, ovakvo poređenje ne treba posmatrati kao strogo geometrijsko podudaranje dimenzija molekula i pora. Izračunate molekulске dimenzije odnose se na izolovane konformere i ne predstavljaju rigidne kinetičke prečnike u vodenom rastvoru, dok NLDFT vrednosti predstavljaju karakteristične širine unutar raspodele veličina pora, a ne uniformne prečnike svih pora prisutnih u

materijalu. Zbog toga ovi podaci pre svega omogućavaju kvalitativnu procenu sternih i orijentacionih ograničenja pri pristupu poroznoj mreži.

Od ispitivanih boja, MB ima najmanji efektivni poprečni presek i gotovo planarnu fenotiazinsku strukturu. Takva geometrija omogućava povoljnu orijentaciju molekula pri prolasku kroz uže otvore pora, što je naročito značajno za JR900 i AS900, sa karakterističnim širinama pora od 1,18 i 1,64 nm, kao i za SI900, kod kojeg ova vrednost iznosi 1,92 nm. Efikasna iskorišćenost razvijene mikroporozne strukture naročito je izražena kod JR900, što je u skladu sa njegovim visokim adsorpcionim kapacitetom za MB. Pored geometrijske pristupačnosti, planarni aromatični sistem MB omogućava i povoljne π - π interakcije sa aromatičnim i delimično grafitizovanim domenima ugljeničnog materijala.

RB ima najveće ukupne molekulske dimenzije među ispitivanim bojama, ali njegova struktura sadrži rotirajuću karboksifenil grupu, koja molekulu daje izraženu konformacionu fleksibilnost. Zbog toga velike ukupne dimenzije RB ne predstavljaju nužno direktnu prepreku adsorpciji. Promena konformacije i orijentacije može omogućiti pristup širim delovima porozne mreže i ulazima pora, dok se adsorpcija može odvijati i na spoljašnjoj površini adsorbensa. Ovakva mogućnost posebno dolazi do izražaja kod SI400, čija karakteristična širina pora od 9,63 nm ukazuje na znatno otvoreniju poroznu strukturu, ali i kod materijala sa užim porama ukoliko njihova raspodela obuhvata dovoljno široke ulaze i prelazne pore. Time se može objasniti činjenica da RB, uprkos velikim molekulskim dimenzijama, pokazuje visoke adsorpcione kapacitete, naročito na JR900.

Posebno je značajno poređenje CV i MG. Iako su njihove ukupne molekulske dimenzije slične, CV ima izraženije razgranatu i relativno simetričnu trifenilmetansku strukturu sa tri dimetilamino grupe, što povećava njegov efektivni poprečni presek i uvodi izraženija sterička i orijentaciona ograničenja. Zbog toga pristup užim porama JR900, AS900 i SI900 može biti otežan, čak i kada nominalne dimenzije molekula ukazuju da bi određene orijentacije mogle biti geometrijski moguće. Ovo je u skladu sa izotermским rezultatima za CV, kod kojeg je uočen visok afinitet prema dostupnim adsorpcionim mestima, ali relativno ograničen maksimalni kapacitet, što ukazuje da veliki deo unutrašnje površine nije podjednako pristupačan ovom molekulu.

MG ima sličnu trifenilmetansku osnovu, ali samo dve dimetilamino grupe i nešto manji efektivni poprečni presek, odnosno manji stepen sternog ometanja u odnosu na CV. Takva struktura omogućava veću slobodu orijentacije pri ulasku u pore i potencijalno pristup većem delu porozne mreže, što može doprineti njegovim višim adsorpcionim kapacitetima. Razlika između ponašanja CV i MG zato jasno pokazuje da najveća molekulska dimenzija sama po sebi nije dovoljan parametar za predviđanje pristupačnosti pora, već je potrebno uzeti u obzir efektivni poprečni presek, trodimenzionalnu geometriju, konformacionu fleksibilnost i mogućnost odgovarajuće orijentacije molekula pri ulasku u pore.

Poređenje sva četiri ugljenična materijala dodatno potvrđuje ovaj zaključak. Kod SI400, sa karakterističnom širinom pora od 9,63 nm, geometrijska ograničenja za pristup ispitivanih boja poroznoj strukturi znatno su manja, pa drugi faktori, kao što su specifična površina i hemijska priroda aktivnih mesta, mogu imati veći relativni značaj. Nasuprot tome, kod SI900, JR900 i AS900, sa karakterističnim širinama pora u opsegu 1,18-1,92 nm, molekulska geometrija i orijentacija postaju značajniji faktori koji određuju koliki deo unutrašnje površine adsorbensa može efektivno da učestvuje u adsorpciji.

Tabela 23. Izračunate dimenzije ispitivanih katjona boja i poređenje sa karakterističnim širinama pora materijala JR900 i AS900, određenim primenom NLDFT metode

Katjonska boja	Molekulska struktura i geometrija	Geometrijske dimenzije određene na osnovu centara atoma* $L \times W \times T$ [nm]	Približne van der Waalove dimenzije** $L \times W \times T$ [nm]	Značaj za pristupačnost pora (SI400 – 9,63 nm; SI900 – 1,92 nm; JR900 – 1,18 nm; AS900 – 1,64 nm)***
MB	Gotovo planarna fenotiazinska struktura	1.410×0.566×0.299	1.650×0.806×0.539	Mali efektivni poprečni presek i planarna geometrija pogoduju pristupu užim porama
RB	Ksantenski hromofor sa rotirajućom karboksifenil grupom; konformaciono prilagodljiv	1.496×1.151×0.681	1.736×1.391×0.921	Velike ukupne dimenzije molekula, ali njegova orijentacija, konformaciona fleksibilnost i adsorpcija u širim porama ili na spoljašnjim aktivnim mestima mogu olakšati vezivanje
CV	Visoko razgranata i relativno simetrična trifenilmetanska struktura sa tri dimetilamino grupe	1.389×1.157×0.439	1.629×1.397×0.679	Veliki efektivni poprečni presek i propelerska geometrija dovode do izraženih sternih i orijentacionih ograničenja
MG	Trifenilmetanska struktura sa dve dimetilamino grupe; manje sterne smetnje u odnosu na CV	1.357×1.044×0.442	1.597×1.288×0.682	Nešto manji efektivni poprečni presek u odnosu na CV može omogućiti pristup većem delu mreže pora

* Geometrijske dimenzije izračunate su na osnovu trodimenzionalnih SDF koordinata primenom graničnog kvadra poravnatog prema glavnim komponentama (*principal-component-aligned bounding box*).

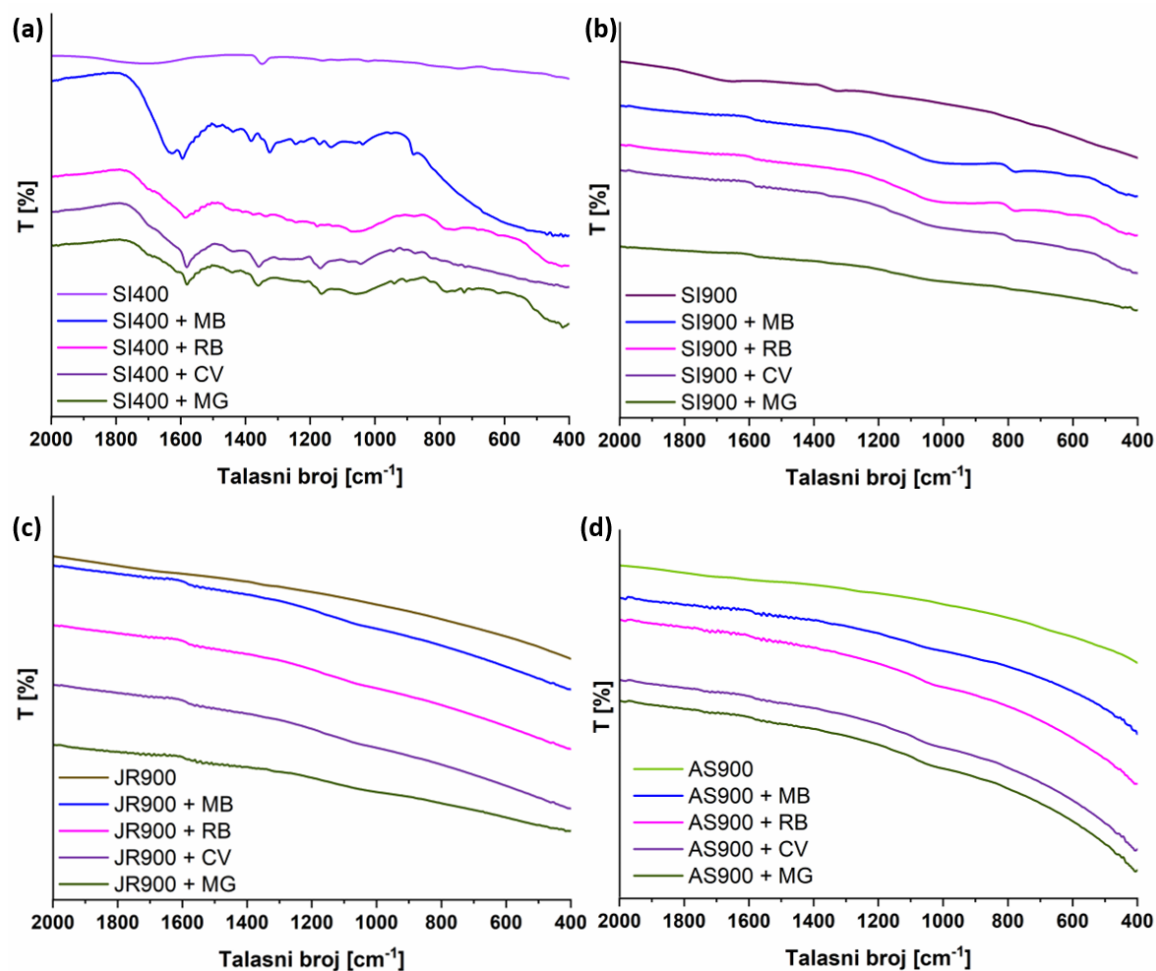
** Približne van der Waalove dimenzije procenjene su uzimajući u obzir van der Waalove poluprečnike atoma koji čine molekul. Ove vrednosti opisuju izolovane molekulske konformere i ne treba ih tumačiti kao rigidne kinetičke prečnike u vodenom rastvoru.

*** NLDFT vrednosti predstavljaju karakteristične širine pora unutar raspodele veličina pora, a ne uniformne prečnike cilindričnih pora.

Dodatne informacije o adsorpciji ispitivanih boja dobijene su analizom FTIR spektara materijala nakon adsorpcije (Slika 24). Najizraženije promene uočene su kod SI400. Spektar početnog SI400 u prikazanom spektralnom području karakteriše odsustvo jasno izraženih apsorpcionih traka, dok se nakon adsorpcije boja pojavljuju nove i znatno izraženije spektralne karakteristike, naročito u oblasti $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ na 1320 cm^{-1} i 1180 cm^{-1} . Promene su posebno uočljive nakon adsorpcije MB. Budući da odgovarajuće trake nisu jasno prisutne u spektru početnog materijala, njihova pojava nakon adsorpcije može se prvenstveno povezati sa vibracijama funkcionalnih grupa i aromatičnih struktura adsorbovanih molekula boja, odnosno predstavlja potvrdu njihovog prisustva na površini SI400. Istovremeno, eventualne promene položaja i oblika ovih traka mogu biti posledica interakcija adsorbata sa ugljeničnom površinom, ali se samo na osnovu FTIR spektara ne može zaključiti da dolazi do formiranja novih kovalentnih veza.

Nasuprot tome, kod SI900, JR900 i AS900 spektri nakon adsorpcije u velikoj meri zadržavaju karakteristike početnih materijala, bez pojave jasno izdvojenih novih traka ili izraženih pomeranja apsorpcionih maksimuma. Ovakav rezultat ne ukazuje na odsustvo adsorpcije, budući da upravo materijali karbonizovani na $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ pokazuju visoke adsorpcione kapacitete. Naprotiv, rezultati ukazuju da adsorpcija na ovim materijalima nije praćena značajnim promenama hemijske strukture površine koje bi bile lako registrovane FTIR spektroskopijom. Molekuli boja mogu biti vezani nekovalentnim interakcijama i smešteni unutar razvijene porozne strukture, pri čemu njihov vibracioni doprinos ukupnom spektru može biti relativno slab ili prekriven širokim i slabo izraženim signalima ugljeničnog materijala.

Razlika između SI400 i materijala karbonizovanih na $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoga ne treba da se tumači jednostavno kao razlika u stepenu adsorpcije. Kod SI400 FTIR spektroskopija jasnije registruje prisustvo adsorbovanih molekula na dostupnoj površini, dok kod SI900, JR900 i AS900 visoka adsorpciona efikasnost, uprkos malim promenama FTIR spektara, ukazuje na značajniju ulogu razvijene porozne strukture, ispunjavanja pora i nekovalentnih interakcija, pre svega $\pi\text{--}\pi$, hidrofobnih, disperzionih i, u zavisnosti od površinskih grupa i uslova rastvora, elektrostatičkih interakcija i vodoničnih veza.



Slika 24. FTIR spektri ugljeničnih materijala: (a) SI400, (b) SI900, (c) JR900 i (d) AS900 pre i nakon adsorpcije MB, RB, CV i MG.

Kombinacija kinetičkih rezultata, izotermske analize, teksturalne karakterizacije, FTIR spektroskopije i analize molekulskih dimenzija pokazuje da maksimalni adsorpcioni kapacitet sam po sebi nije dovoljan pokazatelj efikasnosti adsorbenta. Adsorpciono ponašanje ispitivanih sistema određeno je zajedničkim delovanjem teksturalnih svojstava adsorbensa, pristupačnosti porozne mreže, molekulskih dimenzija, geometrije i konformacione fleksibilnosti adsorbata, kao i prirode interakcija između molekula boje i ugljenične površine. Rezultati ukazuju da kod materijala karbonizovanih na 900 °C, naročito JR900, dominantan doprinos imaju razvijena mikroporoznost, efikasno ispunjavanje pora i nekovalentne interakcije, pre svega π - π , hidrofobne, disperzione i elektrostatičke interakcije, dok odsustvo izraženih promena u FTIR spektrima nakon adsorpcije ne ukazuje na formiranje novih jakih hemijskih veza. Nasuprot tome, kod SI400 prisustvo izraženijih spektralnih promena nakon adsorpcije ukazuje na veći doprinos interakcija adsorbovanih molekula sa dostupnom površinom materijala. Poređenje MB, RB, CV i MG dodatno pokazuje da sama veličina molekula nije dovoljna za predviđanje adsorpcionog ponašanja, već da presudnu ulogu imaju efektivni poprečni presek, trodimenzionalna geometrija, mogućnost odgovarajuće orijentacije i pristup različitim delovima porozne mreže. U celini, dobijeni rezultati pokazuju da je adsorpcija ispitivanih katjonskih boja dominantno fizičke prirode i da se njena efikasnost određuje međusobnom usklađenošću strukture pora, dostupne površine i molekulskih karakteristika adsorbata, pri čemu se relativni značaj pojedinačnih mehanizama razlikuje od sistema do sistema [286].

5.4.4. Adsorpcija katjonskih boja pri dinamičkim uslovima, regeneracija i ponovna upotreba

Ciklična adsorpciono-desorpciona ispitivanja izvedena su u dinamičkim uslovima, pri čemu je rastvor boje propušan kroz filter napunjen ispitivanim ugljeničnim materijalom. Nulti ciklus predstavlja početno ispitivanje adsorpcije, pre prve regeneracije materijala. Nakon svakog adsorpcionog ciklusa vezana boja je desorbovana ispiranjem 50% rastvorom etanola, nakon čega je isti adsorbens ponovo korišćen u narednom ciklusu. Na taj način praćene su efikasnost adsorpcije (%ads), efikasnost desorpcije (%des) i ukupna efikasnost regeneracije (%reg) tokom ponovljene upotrebe materijala (Tabela 24, Slike 25 i 26). Rezultati pokazuju izražene razlike između ispitivanih materijala i boja, što ukazuje da uspešnost višeciklične primene nije određena samo ravnotežnim adsorpcionim kapacitetom ili specifičnom površinom adsorbensa. Pri dinamičkim uslovima dodatni značaj imaju dostupnost adsorpcionih mesta pri ograničenom vremenu kontakta, transport molekula kroz poroznu strukturu, kao i mogućnost njihovog naknadnog oslobađanja tokom regeneracije.

Tabela 24. Ciklična efikasnost adsorpcije, desorpcije i regeneracije katjonskih boja

Boja	Ciklus	SI400			SI900			JR900			AS900		
		%ad s	%de s	%re g	%ad s	%de s	%re g	%ad s	%de s	%re g	%ad s	%de s	%re g
MB	0	67,7	95,5	64,7	81,8	79,1	64,6	51,9	48,1	25,0	39,0	35,8	13,9
	1	82,3	97,5	80,2	75,0	94,5	70,9	65,0	46,3	30,1	38,4	35,2	13,5
	2	81,1	103	84,0	76,2	98,5	75,0	26,9	24,5	6,6	35,8	30,5	10,9
	3	74,1	97,9	72,5	75,5	99,3	75,0	27,5	23,3	6,4	22,5	22,3	5,0
	4	68,2	98,2	67,0	74,4	103	77,0	28,5	25,3	7,2	26,5	23,5	6,2
	5	63,0	99,1	62,4	66,7	93,6	62,4	27,5	23,3	6,4	23,2	21,1	4,9
RB	0	73,6	81,3	59,8	97,7	86,7	84,7	100	94,5	94,5	69,1	65,8	45,5
	1	87,0	83,3	72,4	99,3	106	105	100	97,5	97,5	73,9	70,1	51,8
	2	59,0	81,0	47,8	85,0	94,7	80,5	100	96,5	96,5	74,1	71,6	53,0
	3	52,8	80,0	42,3	87,9	93,9	82,5	100	95,4	95,4	74,6	72,0	53,7
	4	48,8	82,0	40,0	82,4	96,6	79,6	100	98,8	98,8	74,6	71,4	53,2
	5	55,6	79,1	44,0	85,1	99,3	84,5	100	97,8	97,8	74,2	70,9	52,6
CV	0	82,7	73,7	61,0	85,9	91,4	78,4	4,7	3,5	0,2	31,1	16,1	5,0
	1	95,8	76,9	73,6	96,4	98,5	95,0	11,7	8,5	1,0	15,0	13,5	2,0
	2	67,4	74,7	50,3	85,1	93,5	79,5	3,2	2,6	0,1	17,5	16,2	2,8
	3	42,3	71,9	30,4	83,7	103	86,4	3,3	2,8	0,1	17,4	14,9	2,6
	4	47,6	64,8	30,9	87,7	94,9	83,2	1,5	1,3	0,0	15,5	12,6	2,0
	5	17,7	43,1	7,6	83,1	98,4	81,8	1,7	1,3	0,0	13,9	11,5	1,6
MG	0	27,9	97,3	27,2	81,9	93,6	76,6	20,1	17,8	3,6	20,1	18,5	3,7
	1	39,1	98,7	38,6	72,6	97,6	70,8	15,9	14,2	2,3	23,7	20,5	4,9
	2	24,7	97,4	24,1	66,5	104	69,5	15,2	15,0	2,3	24,5	22,1	5,4
	3	29,0	95,6	27,7	65,7	95,3	62,6	16,2	14,2	2,3	23,8	22,0	5,2
	4	21,9	96,7	21,1	71,3	96,3	68,7	15,5	13,5	2,1	23,1	21,7	5,0
	5	21,2	97,7	20,7	66,2	98,4	65,2	15,2	14,0	2,1	23,5	21,0	4,9

SI900 pokazuje najuravnoteženije ponašanje prema svim ispitivanim bojama. Za MB adsorpcija se smanjuje sa 81,8% u početnom na 66,7% u petom ciklusu, dok regeneracija ostaje relativno stabilna i menja se sa 64,6 na 62,4%. Za RB početna adsorpcija iznosi 97,7%, a regeneracija 84,7%, dok se u petom ciklusu zadržavaju visoke vrednosti od 85,1% za adsorpciju i 84,5% za regeneraciju. Dobra ciklična stabilnost SI900 uočena je i za CV. Adsorpcija se neznatno menja, sa 85,9% u početnom na 83,1% u petom ciklusu, dok regeneracija iznosi 78,4%, odnosno 81,8%. Kod MG dolazi do nešto izraženijeg smanjenja adsorpcije, sa 81,9 na 66,2%, uz smanjenje regeneracije sa 76,6 na 65,2%, ali su i nakon pet ciklusa ove vrednosti znatno više nego kod većine ostalih ispitivanih materijala. Ovakvo ponašanje SI900 može se povezati sa povoljnom kombinacijom razvijene porozne strukture, pristupačnosti pora i hemijskih svojstava površine. Karbonizacija na 900 °C dovodi do znatno razvijenije poroznosti u odnosu na SI400 i većeg stepena aromatizacije ugljenične matrice. Karakteristična širina pora od približno 1,92 nm omogućava pristup različitim molekulima boja značajnom delu porozne mreže, dok aromatični domeni omogućavaju π - π interakcije, a negativno površinsko naelektrisanje pri odgovarajućim pH vrednostima pogoduje elektrostatičkom privlačenju katjonskih boja. Rezultati cikličnih ispitivanja pokazuju da SI900 ostvaruje povoljan kompromis između efikasne adsorpcije i mogućnosti naknadne desorpcije adsorbovanih molekula.

Ipak, posebno značajan rezultat predstavlja ponašanje SI400, imajući u vidu da je ovaj materijal dobijen karbonizacijom na znatno nižoj temperaturi. Uprkos veoma maloj specifičnoj površini i slabije razvijenoj poroznoj strukturi, SI400 pokazuje dobru cikličnu stabilnost za pojedine adsorbate, naročito za MB. Adsorpcija MB se menja sa 67,7% u početnom na 63,0% u petom ciklusu, dok regeneracija praktično ostaje nepromenjena, sa 64,7 na 62,4%. Za RB se tokom ciklusa uočava nešto izraženije smanjenje efikasnosti, pri čemu adsorpcija opada sa 73,6 na 55,6%, a regeneracija sa 59,8 na 44,0%. Najizraženiji gubitak efikasnosti SI400 javlja se kod CV. Iako početna adsorpcija iznosi 82,7%, do petog ciklusa opada na svega 17,7%, dok se regeneracija smanjuje sa 61,0 na 7,6%. Kod MG je adsorpcija od samog početka relativno niska, 27,9%, i u petom ciklusu iznosi 21,2%. Međutim, desorpcija MG je veoma efikasna, 97,3% u početnom i 97,7% u petom ciklusu, tako da regeneraciona efikasnost praktično prati adsorpcionu i iznosi 27,2, odnosno 20,7%. Rezultati dobijeni za SI400 ukazuju da razvijena mikroporoznost i velika specifična površina nisu jedini preduslovi za uspešnu ponovnu upotrebu adsorbensa. Stabilno ponašanje prema MB može se povezati sa njegovim manjim efektivnim poprečnim presekom i gotovo planarnom molekulskom strukturom, kao i sa dobrom kompatibilnošću sa dostupnim adsorpcionim mestima na površini SI400. Nasuprot tome, kod sterno zahtevnijeg CV tokom ponovljene upotrebe dolazi do izraženog smanjenja dostupnosti adsorpcionih mesta. Sa praktičnog stanovišta, dobra ciklična stabilnost SI400 prema određenim adsorbatima posebno je značajna jer pokazuje da se funkcionalan i regenerabilan adsorbens može dobiti i pri nižoj temperaturi karbonizacije, što podrazumeva manji energetska zahtev procesa.

JR900 pokazuje najizraženiju selektivnost među ispitivanim materijalima. Izuzetno povoljni rezultati dobijeni su za RB, kod kojeg adsorpcija iznosi 100% i u početnom i u petom ciklusu, dok regeneracija iznosi 94,5%, odnosno 97,8%. Visoka efikasnost održava se tokom čitavog ispitivanja, što ukazuje na izuzetno povoljnu kombinaciju adsorpcije i reverzibilnog vezivanja RB na ovom materijalu. Nasuprot tome, za MB adsorpcija na JR900 opada sa 51,9% u početnom na 27,5% u petom ciklusu, dok se regeneracija smanjuje sa 25,0 na 6,4%. Još niže vrednosti dobijene su za CV, kod kojeg adsorpcija iznosi svega 4,7% u početnom i 1,7% u petom ciklusu, uz praktično zanemarljivu regeneraciju. Kod MG adsorpcija iznosi 20,1% u početnom i 15,2% u petom ciklusu, a regeneracija 3,6 i 2,1%, redom. Ovakvo ponašanje JR900 je posebno značajno kada se uporedi sa ravnotežnim ispitivanjima, u kojima ovaj materijal pokazuje veoma visoke adsorpcione kapacitete. Njegova velika specifična površina i razvijena mikroporoznost očigledno ne predstavljaju same po sebi garanciju visoke efikasnosti u dinamičkim uslovima. Karakteristična širina pora od približno 1,18 nm može ograničiti transport pojedinih molekula pri kratkom vremenu kontakta, dok rezultati za RB pokazuju da odgovarajuća molekulska geometrija,

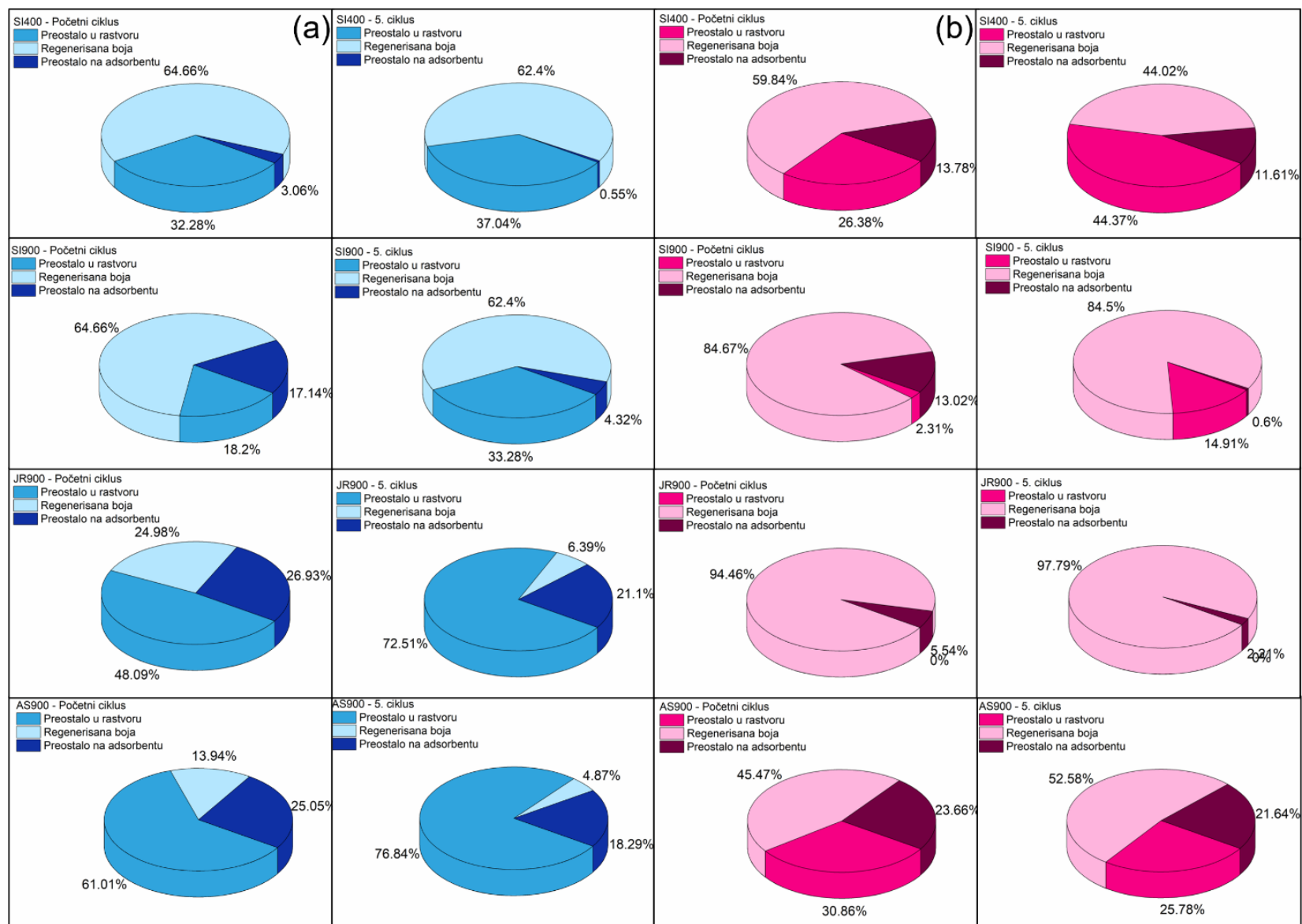
konformaciona fleksibilnost i interakcije sa aromatičnom površinom mogu omogućiti izuzetno efikasno korišćenje porozne strukture.

AS900 takođe pokazuje selektivnije ponašanje, sa najboljim rezultatima za RB. Kod ove boje adsorpcija blago raste sa 69,1% u početnom na 74,2% u petom ciklusu, dok regeneracija raste sa 45,5 na 52,6%. Za MB su vrednosti znatno niže i tokom ciklusa dodatno opadaju: adsorpcija sa 39,0 na 23,2%, a regeneracija sa 13,9 na 4,9%. Za CV na AS900 početna adsorpcija iznosi 31,1%, a regeneracija 5,0%, dok se u petom ciklusu smanjuju na 13,9 i 1,6%. MG pokazuje nešto stabilnije, ali i dalje nisko uklanjanje: adsorpcija iznosi 20,1% u početnom i 23,5% u petom ciklusu, a regeneracija 3,7 i 4,9%. Stoga se kod AS900, kao i kod JR900, jasno uočava zavisnost dinamičke efikasnosti od strukture adsorbata.

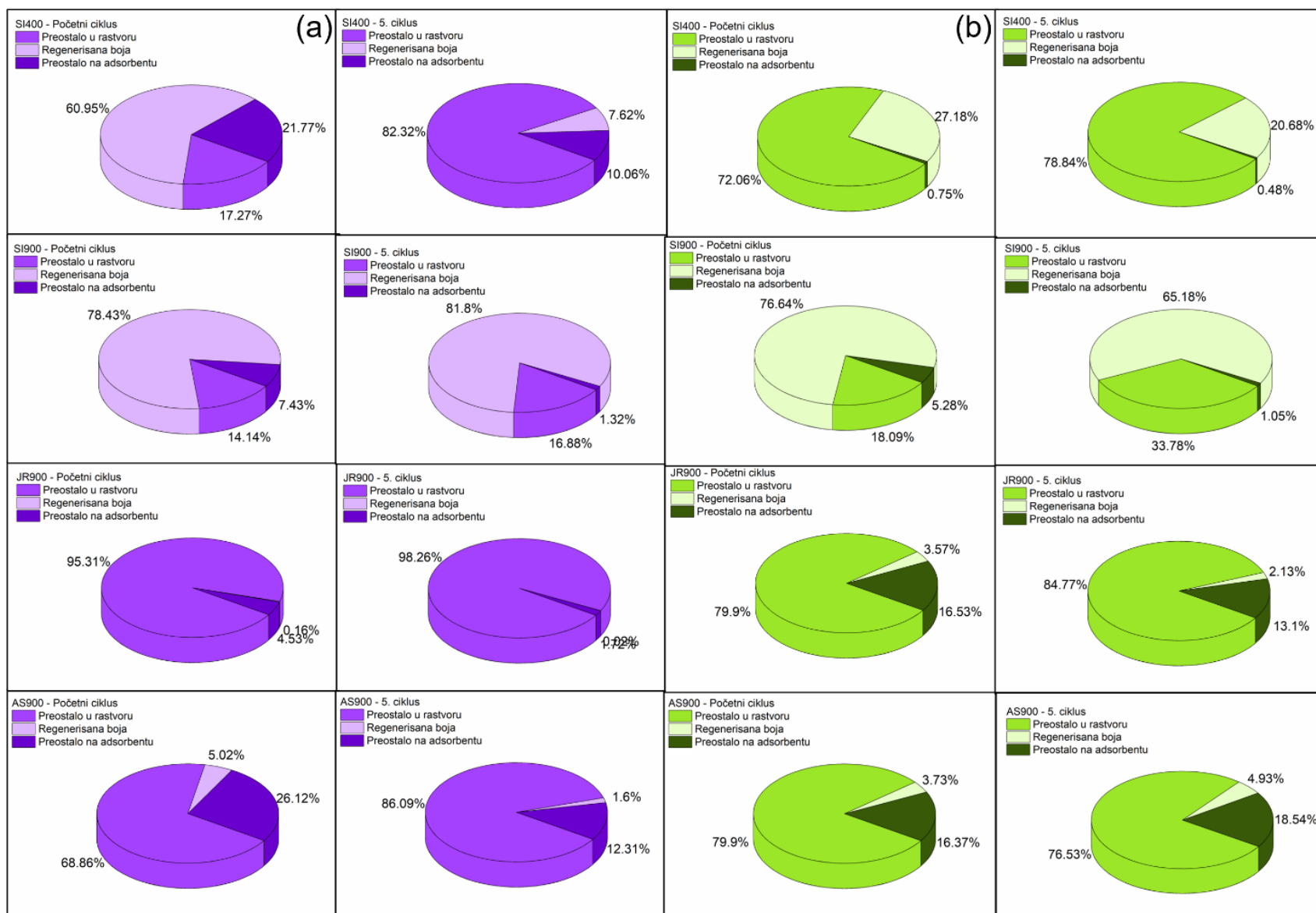
Poređenje pojedinačnih adsorbata pokazuje da MB ima najstabilnije ponašanje na SI materijalima, uključujući SI400, što je posebno značajno imajući u vidu njegovu nižu temperaturu karbonizacije. RB pokazuje najbolje ukupno ciklično ponašanje, naročito na JR900, gde je adsorpcija potpuna, a regeneracija gotovo kvantitativna, ali dobre rezultate daje i na SI900. CV pokazuje najveću zavisnost od strukture adsorbensa: njegova efikasnost izrazito opada na SI400 i praktično je zanemarljiva na JR900, dok SI900 omogućava stabilnu adsorpciju i regeneraciju tokom svih ciklusa. MG takođe jasno izdvaja SI900 kao najpogodniji adsorbens, dok na preostalim materijalima njegova adsorpcija ostaje znatno niža.

Kružni dijagrami na Slikama 25 i 26 prikazuju raspodelu početne količine boje nakon adsorpciono-desorpcionog ciklusa na frakciju preostalu u rastvoru, regenerisanu frakciju i frakciju koja je nakon desorpcije ostala vezana za adsorbens. Ovakav prikaz omogućava razlikovanje sistema kod kojih je ograničavajući faktor nedovoljna adsorpcija od sistema u kojima se značajan deo boje adsorbuje, ali se ne može u potpunosti desorbovati tokom regeneracije.

U celini, SI900 se pokazao kao najpogodniji materijal za višekratnu primenu kada se istovremeno razmatraju sve četiri katjonske boje. Njegova prednost nije u najvećem pojedinačnom adsorpcionom kapacitetu, već u tome što ostvaruje relativno visoku i stabilnu adsorpciju uz efikasnu regeneraciju za strukturno različite adsorbate. Istovremeno, veoma dobro i stabilno ponašanje SI400 prema MB predstavlja važan rezultat, jer pokazuje da niža temperatura karbonizacije i skromnije teksturalne karakteristike ne isključuju mogućnost efikasne i višekratne primene materijala kada postoji odgovarajuća kompatibilnost adsorbensa i adsorbata. Takav rezultat dodatno povećava praktični značaj SI400, jer ukazuje na mogućnost smanjenja energetske potrebe pri dobijanju funkcionalnog adsorbensa. JR900, uprkos najvećoj specifičnoj površini i veoma visokim ravnotežnim kapacitetima, u dinamičkim uslovima pokazuje izraženu selektivnost, sa izuzetnim ponašanjem prema RB i znatno slabijim rezultatima za ostale boje. Dobijeni rezultati potvrđuju da praktična primenljivost adsorbensa zavisi od međusobne usklađenosti porozne strukture i površinskih svojstava materijala sa molekulskim dimenzijama, geometrijom i konformacionom fleksibilnošću adsorbata, kao i od brzine transporta i reverzibilnosti vezivanja u uslovima ponovljene dinamičke primene.



Slika 25. Raspodela boje tokom ciklične adsorpcije–desorpcije (a) MB i (b) RB na materijalima SI400, SI900, JR900 i AS900, Prikazane su frakcije boje koje su ostale u rastvoru, regenerisane desorpcijom i ireverzibilno zadržane na adsorbentu u početnom i petom ciklusu.



Slika 26. Raspodela boje tokom ciklične adsorpcije–desorpcije (a) CV i (b) MG na materijalima SI400, SI900, JR900 i AS900, Prikazane su frakcije boje koje su ostale u rastvoru, regenerisane desorpcijom i ireverzibilno zadržane na adsorbentu u početnom i petom ciklusu.

6. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije razvijen je integrisan pristup sukcesivnom korišćenju biomase biljnih vrsta *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum*, zasnovan na korišćenju istog biljnog prekursora za dobijanje dve različite klase funkcionalnih materijala. Etanolni ekstrakti odabranih biljnih vrsta korišćeni su kao prirodni redukcion i stabilizacioni agensi za zelenu sintezu nanočestica srebra, dok je čvrsti deo istog početnog biljnog materijala, preostao nakon ekstrakcije, dalje korišćen kao prekursor za dobijanje ugljeničnih materijala karbonizacijom. Na taj način ista početna biomasa sukcesivno je iskorišćena u dva međusobno povezana procesa, čime je ostvareno njeno potpunije korišćenje u skladu sa principima zelene hemije, cirkularne ekonomije i održivog razvoja. Ovakav koncept predstavlja osnovnu poveznicu svih istraživanja sprovedenih u okviru disertacije.

Primenom etanolnih ekstrakata sve tri biljne vrste uspešno su sintetisane AgNPs. UV-Vis spektroskopijom registrovani su karakteristični maksimumi lokalizovane površinske plazmonske rezonance u oblasti od približno 400 do 415 nm, dok je XRD analizom kod svih uzoraka potvrđeno formiranje kristalne faze metalnog srebra sa površinski centriranom kubnom strukturom. Morfološka i koloidna karakterizacija pokazala je, međutim, da izbor biljnog prekursora značajno utiče na svojstva formiranih nanočestica. Sva tri sistema sadržala su pretežno sferične AgNPs, ali su se razlikovala u stepenu agregacije, hidrodinamičkoj veličini i koloidnoj stabilnosti. AS-Ag se izdvojio kao najfinije dispergovan i elektrostatistički najstabilniji sistem, dok je JR-Ag pokazao izraženiju sklonost ka aglomeraciji. FTIR analizom potvrđeno je prisustvo organskih funkcionalnih grupa poreklom iz biljnih ekstrakata na površini AgNPs, što pokazuje da, iako sva tri tipa nanočestica imaju isto metalno jezgro, njihov površinski biomolekulski omotač zavisi od hemijskog sastava korišćenog biljnog ekstrakta.

Biološka ispitivanja pokazala su da se razlike u fizičko-hemijskim i površinskim svojstvima sintetisanih AgNPs odražavaju i na njihov biološki profil. Efekti nanočestica zavisili su od biljnog prekursora, primenjene koncentracije i korišćenog ćelijskog modela. Na TK6 ćelijama SI-Ag je pokazao izražen i konzistentan koncentraciono-zavisani genotoksični i citostatski odgovor, praćen povećanjem učestalosti mikronukleusa i smanjenjem proliferativnog kapaciteta ćelija. JR-Ag je ispoljio najizraženiji citotoksični potencijal, sa naglim smanjenjem vijabilnosti pri višim koncentracijama, dok je AS-Ag generalno izazivao blaže biološke efekte i omogućavao veći stepen očuvanja ćelijske vijabilnosti. Dobijeni rezultati potvrđuju da biološko delovanje zeleno sintetisanih AgNPs nije određeno samo prisustvom srebrnog jezgra, već i svojstvima površinskog sloja formiranog biomolekulima poreklom iz biljnog ekstrakta.

Sve tri vrste AgNPs indukovale su apoptozu TK6 ćelija, ali različitim intenzitetom i koncentracionim obrascem. SI-Ag je pokazao najizraženiji koncentraciono-zavisani porast apoptoze, JR-Ag snažan apoptotski odgovor naročito pri višim koncentracijama, dok je efekat AS-Ag bio blaži. Promene produkcije ROS nisu u svim slučajevima neposredno pratile promene vijabilnosti i apoptoze. Pri visokim koncentracijama pojedinih AgNPs smanjenje nivoa ROS bilo je praćeno snažnim padom vijabilnosti i povećanjem apoptoze, što ukazuje da izmereni ROS signal zavisi i od broja i metaboličkog stanja preostalih vijabilnih ćelija. Stoga se biološko delovanje sintetisanih nanočestica ne može objasniti jedinstvenim mehanizmom zasnovanim isključivo na oksidativnom stresu, već predstavlja rezultat više međusobno povezanih ćelijskih procesa.

Ispitivanja na adherentnim MRC-5, HeLa i A549 ćelijama dodatno su pokazala izraženu zavisnost odgovora od tipa ćelijske linije. Uočeni različiti obrasci promena vijabilnosti i ROS potvrđuju da isti tip AgNPs ne izaziva identičan efekat u različitim biološkim sistemima. Posebno je značajno da nije utvrđen jednostavan obrazac selektivnog delovanja prema tumorskim u odnosu na normalne ćelije koji bi bio

zajednički svim ispitivanim nanočesticama, zbog čega se njihova potencijalna dalja primena mora razmatrati pojedinačno, na osnovu detaljno definisanog fizičko-hemijskog i biološkog profila.

Dodatni uvid u biološku aktivnost sintetisanih AgNPs dobijen je ispitivanjem njihovog uticaja na aktivnost acetilholinesteraze. SI-Ag i JR-Ag pokazali su snažan inhibicioni potencijal, pri čemu su pri koncentracijama od 10 ppm i višim doveli do gotovo potpune inhibicije AChE. Nasuprot tome, AS-Ag je ispoljio znatno blaži inhibicioni efekat, sa vrednostima koje su pri višim koncentracijama dostizale približno 40-47%. Ovi rezultati dodatno potvrđuju da izbor biljnog prekursora utiče na interakciju AgNPs sa biološkim makromolekulima i ukazuju na potrebu da se, pored potencijalnih funkcionalnih primena, pažljivo procene i njihovi mogući neželjeni biološki efekti.

U drugom delu disertacije, čvrsti ostaci istih biljnih materijala koji su prethodno korišćeni za pripremu ekstrakta konvertovani su u ugljenične materijale karbonizacijom na 400 °C i 900 °C. Karakterizacijom je pokazano da konačna svojstva ovih materijala zavise kako od prirode biljnog prekursora tako i od temperature karbonizacije. Povećanje temperature sa 400 na 900 °C dovelo je do značajnog razvoja porozne strukture, povećanja specifične površine i zapremine pora, smanjenja karakterističnih širina pora i povećanja strukturnog uređenja ugljenične matrice. Materijali dobijeni na 400 °C imali su veoma male specifične površine, dok su vrednosti za SI900, JR900 i AS900 iznosile 295, 790 i 177 m² g⁻¹, redom. JR900 se izdvojio najvećom specifičnom površinom i najizraženijim razvojem mikroporoznosti.

Istovremeno je pokazano da termički tretman različitih biljnih prekursora ne prati identičan obrazac. Razlike u elementarnom sastavu i promenama površinske hemije nakon karbonizacije ukazuju da karakteristike početne biomase ostavljaju prepoznatljiv uticaj i na konačna svojstva dobijenog ugljeničnog materijala. Time je potvrđeno da biljni prekursor nije samo izvor ugljenika, već jedan od parametara koji određuju tok karbonizacije, razvoj poroznosti, površinsku hemiju i, posledično, funkcionalna svojstva sintetisanih materijala.

Ispitivanja adsorpcije MB, RB, CV i MG pokazala su da su materijali karbonizovani na 900 °C generalno efikasniji od odgovarajućih materijala dobijenih na 400 °C. Povećanje temperature karbonizacije dovelo je ne samo do povećanja adsorpcionih kapaciteta već i do značajnog ubrzanja adsorpcione kinetike. Kod materijala sa razvijenijom mikroporoznom strukturom veliki deo procesa odvijao se već tokom prvih desetina minuta.

Međutim, rezultati su pokazali da specifična površina sama po sebi nije dovoljan parametar za predviđanje adsorpcionog ponašanja. Povezivanjem kinetičkih i ravnotežnih rezultata sa teksturalnom karakterizacijom, FTIR analizom i molekulskim karakteristikama adsorbata pokazano je da efikasnost adsorpcije zavisi od međusobne usklađenosti strukture adsorbensa i adsorbata. Pored razvijene površine i zapremine pora, značajnu ulogu imaju pristupačnost porozne mreže, efektivni poprečni presek, trodimenzionalna geometrija, konformaciona fleksibilnost i mogućnost odgovarajuće orijentacije molekula boje pri ulasku u pore. Posebno je pokazano da velika ukupna molekulska dimenzija ne mora nužno predstavljati ograničenje za adsorpciju. RB, iako među najvećim ispitivanim molekulima, zahvaljujući svojoj konformacionoj fleksibilnosti pokazuje veoma povoljno adsorpciono ponašanje, naročito na JR900, dok je kod rigidnijeg i razgranatijeg CV pristup delu mikroporozne strukture ograničeniji.

Analiza mehanizma pokazala je da se adsorpcija ispitivanih katjonskih boja dominantno odvija fizičkim putem. Kod materijala karbonizovanih na 900 °C značajan doprinos imaju ispunjavanje pora i različite nekovalentne interakcije, prvenstveno π - π , hidrofobne, disperzione i elektrostatičke interakcije, uz mogući doprinos vodoničnih veza. Odsustvo izraženih novih signala u FTIR spektrima nakon adsorpcije nije ukazivalo na formiranje novih jakih hemijskih veza. Dobijeni rezultati tako potvrđuju da adsorpcioni proces predstavlja rezultat istovremenog delovanja više slabijih interakcija, čiji se relativni značaj menja u zavisnosti od kombinacije adsorbensa i adsorbata.

Posebno značajan deo istraživanja odnosio se na procenu ponašanja odabranih ugljeničnih materijala u dinamičkim uslovima tokom pet adsorpciono-desorpcionih ciklusa. Pokazano je da visoka početna adsorpciona efikasnost i velika specifična površina ne moraju nužno značiti i najbolju pogodnost materijala za višekratnu primenu. Nakon svakog adsorpcionog ciklusa vezane boje desorbovane su 50% rastvorom etanola, čime je omogućena regeneracija adsorbensa i njegova ponovna upotreba. Istovremeno je omogućeno izdvajanje prethodno adsorbovane boje, čime se otvara mogućnost njenog daljeg korišćenja umesto neposrednog odlaganja.

SI900 se izdvojio kao najuniverzalniji materijal za višecikličnu primenu, jer je pokazao najuravnoteženije ponašanje prema svim ispitivanim bojama. Sa druge strane, JR900 je, uprkos najvećoj specifičnoj površini, pokazao izraženu selektivnost koja je zavisila od strukture adsorbata. Posebno povoljan sistem predstavljao je JR900/RB, kod kojeg je ostvarena praktično potpuna adsorpcija i gotovo kvantitativna regeneracija tokom ponovljenih ciklusa. Ovaj rezultat potvrđuje da praktičnu vrednost adsorbensa ne treba procenjivati samo na osnovu maksimalnog adsorpcionog kapaciteta, već istovremeno uzeti u obzir kinetiku adsorpcije, selektivnost, mogućnost desorpcije, stabilnost adsorbensa tokom ponovljene primene i mogućnost izdvajanja adsorbata.

Objedinjavanjem rezultata dobijenih za obe klase materijala pokazano je da isti biljni prekursor može imati dve različite, ali međusobno povezane funkcije. U prvoj fazi predstavlja izvor biomolekula koji omogućavaju redukciju Ag^+ jona, stabilizaciju formiranih nanočestica i formiranje njihovog površinskog omotača. Nakon ekstrakcije, preostali deo iste biomase postaje prekursor za sintezu ugljeničnih materijala čija svojstva zavise od sastava početnog materijala i uslova karbonizacije. Specifične karakteristike biljne vrste tako ostavljaju svoj „otisak“ na obe klase dobijenih materijala – kroz fizičko-hemijska i biološka svojstva AgNPs, sa jedne strane, i kroz elementarni sastav, poroznost, površinsku hemiju, adsorpciona i regeneraciona svojstva ugljeničnih materijala, sa druge strane.

Naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u uspostavljanju integrisanog koncepta sukcesivnog korišćenja istog biljnog prekursora za dobijanje dve različite klase funkcionalnih materijala, kao i u pokazivanju da izbor biljne vrste predstavlja jedan od parametara kojim se mogu usmeravati njihova konačna svojstva. Disertacija doprinosi razumevanju veze između vrste biljnog prekursora i fizičko-hemijskog i biološkog profila zeleno sintetisanih AgNPs, kao i veze između prirode istog prekursora, temperature karbonizacije, strukture ugljeničnih materijala i njihovog adsorpcionog i regeneracionog ponašanja. Poseban doprinos predstavlja sagledavanje adsorpcije ne samo kroz uklanjanje zagađujuće materije iz vode, već kroz celokupan ciklus koji obuhvata adsorpciju, desorpciju, regeneraciju i ponovnu upotrebu adsorbensa, uz mogućnost izdvajanja i daljeg korišćenja adsorbovanih boja.

Na taj način pokazano je da se isti obnovljivi biljni izvor može racionalno i sukcesivno koristiti za dobijanje materijala različitih funkcionalnih svojstava i namena. Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalji razvoj održivih funkcionalnih materijala, optimizaciju njihove sinteze i primene, kao i za buduća istraživanja usmerena ka njihovoj primeni u realnim sistemima za tretman zagađenih voda.

LITERATURA

1. Radulescu, D.-M., et al., *Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: a review of the principles and biomedical applications*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(20): p. 15397.
2. Kirubakaran, D., et al., *A Comprehensive Review on the Green Synthesis of Nanoparticles: Advancements in Biomedical and Environmental Applications*. Biomedical Materials & Devices, 2026. **4**(1): p. 388-413.
3. El-Seedi, H.R., et al., *Metal nanoparticles fabricated by green chemistry using natural extracts: biosynthesis, mechanisms, and applications*. RSC Advances, 2019. **9**(42): p. 24539-24559.
4. Zahoor, M., et al., *A Review on Silver Nanoparticles: Classification, Various Methods of Synthesis, and Their Potential Roles in Biomedical Applications and Water Treatment*. Water, 2021. **13**(16): p. 2216.
5. Tran, Q.H. and A.-T. Le, *Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives*. Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology, 2013. **4**(3): p. 033001.
6. Fahim, M., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles: A comprehensive review of methods, influencing factors, and applications*. JCIS Open, 2024. **16**: p. 100125.
7. Al-Saadi, H.K., et al., *Antioxidant and Antibacterial Activities of Allium sativum Ethanol Extract and Silver Nanoparticles*. Tropical Journal of Natural Product Research, 2023. **7**(6).
8. Abbasi, Z., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of dried Juglans regia green husk and examination of its biological properties*. Green Processing and Synthesis, 2017. **6**(5): p. 477-485.
9. Khandaker, T., et al., *Biomass-derived carbon materials for sustainable energy applications: a comprehensive review*. Sustainable Energy & Fuels, 2025. **9**(3): p. 693-723.
10. Li, W., et al., *Effects of carbonization temperatures on characteristics of porosity in coconut shell chars and activated carbons derived from carbonized coconut shell chars*. Industrial crops and products, 2008. **28**(2): p. 190-198.
11. Devi, R., et al., *Recent advancement in biomass-derived activated carbon for waste water treatment, energy storage, and gas purification: a review*. Journal of Materials Science, 2023. **58**(30): p. 12119-12142.
12. Shanker, U., M. Rani, and V. Jassal, *Degradation of hazardous organic dyes in water by nanomaterials*. Environmental Chemistry Letters, 2017. **15**(4): p. 623-642.
13. <https://sdgs.un.org/goals>, pristupljeno 29.07.2026.
14. Asha, A.B. and R. Narain, *Nanomaterials properties*, in *Polymer science and nanotechnology*. 2020, Elsevier. p. 343-359.
15. Mekuye, B. and B. Abera, *Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications*. Nano Select, 2023. **4**(8): p. 486-501.
16. Khin, M.M., et al., *A review on nanomaterials for environmental remediation*. Energy & Environmental Science, 2012. **5**(8): p. 8075-8109.
17. Dai, L., et al., *Carbon Nanomaterials for Advanced Energy Conversion and Storage*. Small, 2012. **8**(8): p. 1130-1166.
18. Chandrakala, V., V. Aruna, and G. Angajala, *Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems*. Emergent Materials, 2022. **5**(6): p. 1593-1615.

19. Hsu, J.C., et al., *Nanomaterial-based contrast agents*. Nature Reviews Methods Primers, 2023. **3**(1): p. 1-21.
20. Malik, S., et al., *Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review*. Heliyon, 2023. **9**(9).
21. Diez-Pascual, A.M. and A. Rahdar, *Functional Nanomaterials in Biomedicine: Current Uses and Potential Applications*. ChemMedChem, 2022. **17**(16): p. e202200142.
22. Ortega-Nieto, C., et al., *Recent Advances on the Design and Applications of Antimicrobial Nanomaterials*. Nanomaterials, 2023. **13**(17): p. 2406.
23. Ogbeh, G.O., et al., *Adsorption of organic micropollutants in water: A review of advances in modelling, mechanisms, adsorbents, and their characteristics*. Environmental Engineering Research, 2025. **30**(2): p. 230733-0.
24. Tan, K.B., et al., *Adsorption of dyes by nanomaterials: recent developments and adsorption mechanisms*. Separation and purification technology, 2015. **150**: p. 229-242.
25. Rani, M. and U. Shanker, *Degradation of traditional and new emerging pesticides in water by nanomaterials: recent trends and future recommendations*. International Journal of Environmental Science and Technology, 2018. **15**(6): p. 1347-1380.
26. Chauhan, A., D. Sillu, and S. Agnihotri, *Removal of pharmaceutical contaminants in wastewater using nanomaterials: a comprehensive review*. Current drug metabolism, 2019. **20**(6): p. 483-505.
27. Wang, X., et al., *Nanomaterials as sorbents to remove heavy metal ions in wastewater treatment*. J. Environ. Anal. Toxicol, 2012. **2**(7): p. 154-158.
28. Durodola, S.S., et al., *A Review on Nanomaterial as Photocatalysts for Degradation of Organic Pollutants*. Journal of Fluorescence, 2024. **34**(2): p. 501-514.
29. Vilatela, J.J. and D. Eder, *Nanocarbon Composites and Hybrids in Sustainability: A Review*. ChemSusChem, 2012. **5**(3): p. 456-478.
30. Hao, N., L. Li, and F. Tang, *Roles of particle size, shape and surface chemistry of mesoporous silica nanomaterials on biological systems*. International Materials Reviews, 2017. **62**(2): p. 57-77.
31. Khan, Y., et al., *Classification, Synthetic, and Characterization Approaches to Nanoparticles, and Their Applications in Various Fields of Nanotechnology: A Review*. Catalysts, 2022. **12**(11): p. 1386.
32. Huston, M., et al., *Green Synthesis of Nanomaterials*. Nanomaterials, 2021. **11**(8): p. 2130.
33. Gour, A. and N.K. Jain, *Advances in green synthesis of nanoparticles*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2019. **47**(1): p. 844-851.
34. Duman, H., et al., *Silver Nanoparticles: A Comprehensive Review of Synthesis Methods and Chemical and Physical Properties*. Nanomaterials, 2024. **14**(18): p. 1527.
35. Pal, B., S. Rana, and R. Kaur, *Influence of different reducing agents on the Ag nanostructures and their electrokinetic and catalytic properties*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2015. **15**(4): p. 2753-2760.
36. Shafey, A.M.E., *Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review*. Green Processing and Synthesis, 2020. **9**(1): p. 304-339.
37. Bahrulolum, H., et al., *Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector*. Journal of Nanobiotechnology, 2021. **19**(1): p. 86.
38. Osman, A.I., et al., *Synthesis of green nanoparticles for energy, biomedical, environmental, agricultural, and food applications: A review*. Environmental Chemistry Letters, 2024. **22**(2): p. 841-887.

39. Khan, S.H., *Green nanotechnology for the environment and sustainable development*, in *Green materials for wastewater treatment*. 2019, Springer. p. 13-46.
40. Kurian, M., *Waste to Wealth: A review on the recent trends in the green synthesis of nanomaterials using waste*. Next Research, 2026: p. 101957.
41. Lesch, R., et al., *Biomass-derived carbon-based nanomaterials: current research, trends, and challenges*. J. Renew. Mater, 2025. **13**: p. 1935-1977.
42. Kobylecki, R., M. Ścisłowska, and Z. Bis, *Carbonization of biomass—an efficient tool to decrease the emission of CO₂*. Archives of Thermodynamics, 2013. **34**(3): p. 185-195.
43. Kharissova, O.V., et al., *Greener synthesis of chemical compounds and materials*. Royal Society open science, 2019. **6**(11): p. 191378.
44. Ahmed, R., et al., *Green synthesis methods for nanoparticles: Principles, biological routes, and physicochemical approaches toward sustainable nanotechnology*. Next Materials, 2026. **11**: p. 101929.
45. Abbas, R., et al., *Silver Nanoparticles: Synthesis, Structure, Properties and Applications*. Nanomaterials, 2024. **14**(17): p. 1425.
46. Shanmuganathan, R., et al., *Synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications—a comprehensive review*. Current pharmaceutical design, 2019. **25**(24): p. 2650-2660.
47. Mathur, P., et al., *Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2018. **46**(sup1): p. 115-126.
48. Agrawal, S., et al., *Silver nanoparticles and its potential applications: A review*. J. Pharmacogn. Phytochem, 2018. **7**(2): p. 930-937.
49. Ivanišević, I., *The Role of Silver Nanoparticles in Electrochemical Sensors for Aquatic Environmental Analysis*. Sensors, 2023. **23**(7): p. 3692.
50. Dube, E. and G.E. Okuthe, *Silver Nanoparticle-Based Antimicrobial Coatings: Sustainable Strategies for Microbial Contamination Control*. Microbiology Research, 2025. **16**(6): p. 110.
51. Nguyen, N.P.U., et al., *Synthesis of Silver Nanoparticles: From Conventional to 'Modern' Methods—A Review*. Processes, 2023. **11**(9): p. 2617.
52. Abdelghany, T.M., et al., *Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review*. BioNanoScience, 2018. **8**(1): p. 5-16.
53. Eker, F., et al., *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts: A Comprehensive Review of Physicochemical Properties and Multifunctional Applications*. International Journal of Molecular Sciences, 2025. **26**(13): p. 6222.
54. Amirjani, A. and D.F. Haghshenas, *Ag nanostructures as the surface plasmon resonance (SPR)-based sensors: a mechanistic study with an emphasis on heavy metallic ions detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018. **273**: p. 1768-1779.
55. Akintelu, S.A., Y. Bo, and A.S. Folorunso, *A Review on Synthesis, Optimization, Mechanism, Characterization, and Antibacterial Application of Silver Nanoparticles Synthesized from Plants*. Journal of Chemistry, 2020. **2020**(1): p. 3189043.
56. Chota, A., H. Abrahamse, and B.P. George, *Green synthesis and characterization of AgNPs, liposomal loaded AgNPs and ZnPcS4 photosensitizer for enhanced photodynamic therapy effects in MCF-7 breast cancer cells*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2024. **48**: p. 104252.
57. Khalifa, H.O.O., et al., *Silver nanoparticles as next-generation antimicrobial agents: mechanisms, challenges, and innovations against multidrug-resistant bacteria*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2025. **Volume 15 - 2025**.

58. Ahmed, T. and R.T. Ogulata, *A review on silver nanoparticles-green synthesis, antimicrobial action and application in textiles*. Journal of Natural Fibers, 2022. **19**(14): p. 8463-8484.
59. Simbine, E.O., et al., *Application of silver nanoparticles in food packages: a review*. Food Science and Technology, 2019. **39**(4): p. 793-802.
60. Gadkari, R.R., et al., *Silver nanoparticles in water purification: opportunities and challenges*. Modern age environmental problems and their remediation, 2017: p. 229-237.
61. Zafar, M.S., et al., *Silver nanoparticles in water disinfection: a comprehensive overview on their mechanisms, benefits, and limitations*. Archives of Microbiology, 2026. **208**(4): p. 166.
62. Beck, F., M. Loessl, and A.J. Baeumner, *Signaling strategies of silver nanoparticles in optical and electrochemical biosensors: considering their potential for the point-of-care*. Microchimica Acta, 2023. **190**(3): p. 91.
63. Kumar, A., et al., *Recent Advances in Silver Nanoparticles-Catalyzed Reactions*. ChemistrySelect, 2025. **10**(5): p. e202403655.
64. Fiorati, A., et al., *Silver Nanoparticles for Water Pollution Monitoring and Treatments: Ecosafety Challenge and Cellulose-Based Hybrids Solution*. Polymers, 2020. **12**(8): p. 1635.
65. Poopathi, S., et al., *Synthesis of silver nanoparticles from Azadirachta indica—a most effective method for mosquito control*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(4): p. 2956-2963.
66. Anju, T., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and its antimicrobial activity*. Materials Today: Proceedings, 2021. **43**: p. 3956-3960.
67. Khac, K.T., et al., *Biosynthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract (Camellia sinensis) for photocatalyst and antibacterial effect*. Heliyon, 2023. **9**(10).
68. Khane, Y., et al., *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Citrus limon Zest Extract: Characterization and Evaluation of Their Antioxidant and Antimicrobial Properties*. Nanomaterials, 2022. **12**(12): p. 2013.
69. Gupta, S., D.K. Choudhary, and S. Sundaram, *Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Citrus sinensis (Orange peel) Extract and Their Antidiabetic, Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activity*. Waste and Biomass Valorization, 2025. **16**(3): p. 1101-1114.
70. Dutta, T., et al., *Green synthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using Citrus limetta peel extract: Experimental and theoretical studies*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020. **8**(4): p. 104019.
71. Malapermal, V., et al., *Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of Ocimum basilicum, and Ocimum sanctum (L.) using silver nanoparticles*. Saudi journal of biological sciences, 2017. **24**(6): p. 1294-1305.
72. Balčiūnaitienė, A., et al., *Eucalyptus globulus and Salvia officinalis Extracts Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Application as an Antioxidant and Antimicrobial Agent*. Plants, 2022. **11**(8): p. 1085.
73. Mohammed, A.E., *Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles mediated by Eucalyptus camaldulensis leaf extract*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015. **5**(5): p. 382-386.
74. Rodríguez-Félix, F., et al., *Trends in Sustainable Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Agri-Food Waste Extracts and Their Applications in Health*. Journal of Nanomaterials, 2022. **2022**(1): p. 8874003.

75. Soto, K.M., et al., *Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens*. Lwt, 2019. **103**: p. 293-300.
76. Siakavella, I.K., et al., *Effect of Plant Extracts on the Characteristics of Silver Nanoparticles for Topical Application*. Pharmaceutics, 2020. **12**(12): p. 1244.
77. Dube, E., *From Plant Metabolites to Functional Nanomaterials: Advances in Phytochemical-Mediated Silver Nanoparticle Synthesis and Applications*. Micro, 2026. **6**(2): p. 40.
78. Stozhko, N., et al., *Green Silver Nanoparticles: Plant-Extract-Mediated Synthesis, Optical and Electrochemical Properties*. Physchem, 2024. **4**(4): p. 402-419.
79. Mikhailova, E.O., *Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application*. Journal of Functional Biomaterials, 2020. **11**(4): p. 84.
80. Restrepo, C.V. and C.C. Villa, *Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review*. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2021. **15**: p. 100428.
81. Dakal, T.C., et al., *Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles*. Frontiers in Microbiology, 2016. **Volume 7 - 2016**.
82. Zhang, X.-F., W. Shen, and S. Gurunathan, *Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(10): p. 1603.
83. Le Ouay, B. and F. Stellacci, *Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight*. Nano today, 2015. **10**(3): p. 339-354.
84. George, S., et al., *Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos*. ACS Nano, 2012. **6**(5): p. 3745-3759.
85. Yuksekdag, Z., et al., *Biogenic-Synthesized Silver Nanoparticles Using the Ligilactobacillus salivarius KC27L Postbiotic: Antimicrobial, Anti-Biofilm, and Antioxidant Activity and Cytotoxic Effects*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2025. **17**(5): p. 3685-3699.
86. Sarimov, R.M., et al., *Protein Corona as a Result of Interaction of Protein Molecules with Inorganic Nanoparticles*. International Journal of Molecular Sciences, 2025. **26**(19): p. 9771.
87. Chang, X., et al., *ROS-Drp1-mediated mitochondria fission contributes to hippocampal HT22 cell apoptosis induced by silver nanoparticles*. Redox biology, 2023. **63**: p. 102739.
88. Zhang, T., et al., *Cytotoxic potential of silver nanoparticles*. Yonsei medical journal, 2014. **55**(2): p. 283.
89. Liao, C., Y. Li, and S.C. Tjong, *Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(2): p. 449.
90. Dziendzikowska, K., et al., *Coating-Dependent Neurotoxicity of Silver Nanoparticles—An In Vivo Study on Hippocampal Oxidative Stress and Neurosteroids*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(3): p. 1365.
91. Pricop, D., et al., *Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Various Reducing Agents*. Applied Sciences, 2026. **16**(13): p. 6387.
92. Badsha, M.R., et al., *Green synthesis of protein-capped Ag/AgCl nanoparticles from Pila globosa tissue: Evaluation of anticancer potential against MCF-7 cell line and EAC Cells with antimicrobial and antioxidant properties*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2026: p. 122599.
93. Sedighi, O., et al., *Nanoparticle-Based Strategies for Managing Biofilm Infections in Wounds: A Comprehensive Review*. ACS Omega, 2024. **9**(26): p. 27853-27871.

94. Rashid, T.S., et al., *Recent advances in applications, antimicrobial, cytotoxic activities and their associated mechanism of green silver nanoparticles: A review*. Results in Chemistry, 2024. **11**: p. 101849.
95. Tripathi, N. and M.K. Goshisht, *Recent Advances and Mechanistic Insights into Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles*. ACS Applied Bio Materials, 2022. **5**(4): p. 1391-1463.
96. Kovács, D., et al., *Cancer Therapy by Silver Nanoparticles: Fiction or Reality?* International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(2): p. 839.
97. Xu, L., et al., *Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety*. Theranostics, 2020. **10**(20): p. 8996.
98. Baran, A., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles from *Elaeagnus angustifolia* extract: characterization and evaluation of antibacterial and cytotoxic properties*. Discover Nano, 2026. **21**(1): p. 2.
99. Şahin, B., et al., *Investigation of biological activities of plant extract and green synthesis silvernanoparticles obtained from Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruits*. Turkish Journal of Chemistry, 2022. **46**(1): p. 224-235.
100. Das, D. and P. Paul, *Environmental impact of silver nanoparticles and its sustainable mitigation by novel approach of green chemistry*. Plant Nano Biology, 2025: p. 100210.
101. Ahmed, S.F., et al., *Green approaches in synthesising nanomaterials for environmental nanobioremediation: Technological advancements, applications, benefits and challenges*. Environmental research, 2022. **204**: p. 111967.
102. Eranhottu, S., et al., *Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles from the leaf blades extract of seagrass *Thalassia hemprichii*: Multifunctional agents for biomedical and environmental applications*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2025. **23**(4): p. 100600.
103. Rajeshkumar, S. and L.V. Bharath, *Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity*. Chemico-Biological Interactions, 2017. **273**: p. 219-227.
104. Yuan, D., et al., *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019. **108**(1): p. 58-72.
105. Tavukcuoglu, O., et al., *Green-Synthesized Silver Nanoparticles from *Zingiber officinale*: Physicochemical Characterization, Antibacterial Activity, and TMPRSS2-Modulating Potential*. Nanomaterials, 2026. **16**(14): p. 836.
106. Thomas, S., et al., *Plant-based synthesis, characterization approaches, applications and toxicity of silver nanoparticles: A comprehensive review*. Journal of Biotechnology, 2024. **394**: p. 135-149.
107. Uno, Y., et al., *Genetic Resources and Breeding Technology in African Violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)*, in *Breeding of Ornamental Crops: Potted Plants and Shrubs*, J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and M.A. Wani, Editors. 2025, Springer Nature Switzerland: Cham. p. 299-327.
108. Medic, A., et al., *Identification and Quantification of Naphthoquinones and Other Phenolic Compounds in Leaves, Petioles, Bark, Roots, and Buds of *Juglans regia* L., Using HPLC-MS/MS*. Horticulturae, 2021. **7**(9): p. 326.
109. Bhatwalkar, S.B., et al., *Antibacterial Properties of Organosulfur Compounds of Garlic (*Allium sativum*)*. Frontiers in Microbiology, 2021. **Volume 12 - 2021**.
110. Chen, T., M. Dusinska, and R. Elespuru, *Thymidine Kinase+/- Mammalian Cell Mutagenicity Assays for Assessment of Nanomaterials*. Frontiers in Toxicology, 2022. **Volume 4 - 2022**.

111. Vlasceanu, A.-M., et al., *Comparative Cytotoxicity Study of Nicotine and Cotinine on MRC-5 Cell Line*. Journal of Mind and Medical Sciences, 2018. **5**(1): p. 117-122.
112. Elumalai, M., et al., *Evaluation of cytotoxic activity against A549 human lung cancer cells using green synthesized N-Cholyl D-Penicillamine encapsulated silver and gold nanoparticles*. Inorganic Chemistry Communications, 2023. **153**: p. 110834.
113. Awashra, M. and P. Młynarz, *The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an in vitro metabolomic perspective*. Nanoscale Adv, 2023. **5**(10): p. 2674-2723.
114. Wypij, M., et al., *Biogenic Silver Nanoparticles: Assessment of Their Cytotoxicity, Genotoxicity and Study of Capping Proteins*. Molecules, 2020. **25**(13).
115. Barkhordari, A., et al., *The toxic effects of silver nanoparticles on blood mononuclear cells*. Int J Occup Environ Med, 2014. **5**(3): p. 164-8.
116. Reidy, B., et al., *Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications*. Materials, 2013. **6**(6): p. 2295-2350.
117. Sabourian, P., et al., *Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(21): p. 8019.
118. AshaRani, P.V., et al., *Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells*. ACS Nano, 2008. **3**(2): p. 279-290.
119. Elnady, A., N.M. Sorour, and R.N. Abbas, *Characterization, cytotoxicity, and genotoxicity properties of novel biomediated nanosized-silver by Egyptian Streptomyces roseolus for safe antimicrobial applications*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022. **38**(3): p. 47.
120. Herdiana, Y., et al., *Nanoparticle-Based Antioxidants in Stress Signaling and Programmed Cell Death in Breast Cancer Treatment*. Molecules, 2023. **28**(14): p. 5305.
121. Butler, K.S., et al., *Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity*. Mutagenesis, 2015. **30**(4): p. 577-591.
122. Patlolla, A.K., et al., *Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Vicia faba: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2012. **9**(5): p. 1649-1662.
123. Shukla, R.K., et al., *Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA*. Frontiers in Genetics, 2021. **Volume 12 - 2021**.
124. Fenech, M., *The Micronucleus Assay Determination of Chromosomal Level DNA Damage*, in *Environmental Genomics*, C.C. Martin and C.C. Martin, Editors. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. p. 185-216.
125. Ćetković Pećar, T., et al., *In Vitro Genotoxicity Assessment of Commercially Available Graphene Quantum Dots in Human Peripheral Blood Cells and Salivary Leukocytes*. Toxics, 2026. **14**(6): p. 523.
126. Huang, Y.W., M. Cambre, and H.J. Lee, *The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
127. Muhamad, M., et al., *Cytotoxicity and Genotoxicity of Biogenic Silver Nanoparticles in A549 and BEAS-2B Cell Lines*. Bioinorg Chem Appl, 2022. **2022**: p. 8546079.
128. Shayo, G.M., E. Elimbinzi, and G.N. Shao, *Preparation methods, applications, toxicity and mechanisms of silver nanoparticles as bactericidal agent and superiority of green synthesis method*. Heliyon, 2024. **10**(17).
129. Begum, S.J.P., et al., *Recent Advances in Green Synthesis, Characterization, and Applications of Bioactive Metallic Nanoparticles*. Pharmaceuticals (Basel), 2022. **15**(4).

130. Banjara, R.A., et al., *A comparative analysis of chemical vs green synthesis of nanoparticles and their various applications*. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2024. **22**: p. 100988.
131. Qin, Y., et al., *Oxidative Stress: Molecular Mechanisms, Diseases, and Therapeutic Targets*. MedComm (2020), 2026. **7**(2): p. e70600.
132. Manke, A., L. Wang, and Y. Rojanasakul, *Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 942916.
133. Rotariu, D., et al., *Oxidative stress – Complex pathological issues concerning the hallmark of cardiovascular and metabolic disorders*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022. **152**: p. 113238.
134. Kudrinsky, A.A., et al., *Surface-Functionalized Silver Nanoparticles Boost Oxidative Stress and Prime Potatoes Against Phytopathogens*. Plants (Basel), 2026. **15**(2).
135. McMillan, J., E. Batrakova, and H.E. Gendelman, *Cell delivery of therapeutic nanoparticles*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **104**: p. 563-601.
136. Ham, P.B., 3rd and R. Raju, *Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging*. Prog Neurobiol, 2017. **157**: p. 92-116.
137. Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2007. **47**(Volume 47, 2007): p. 143-183.
138. Tiwari, B.S., B. Belenghi, and A. Levine, *Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death*. Plant Physiology, 2002. **128**(4): p. 1271-1281.
139. Eldabousy, E., L. Habbak, and A. Hyder, *Apoptosis and cell cycle arrest of bone marrow cells by green-synthesized silver but not albumin nanoparticles*. Toxicol Rep, 2025. **14**: p. 101960.
140. Mustafa, M., et al., *Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications*. Cells, 2024. **13**(22): p. 1838.
141. Fayadh, S.M., *The apoptosis inducement of green-synthesis silver nanoparticles in medullary thyroid carcinoma cells*. Materials Research Express, 2026. **13**(5): p. 055401.
142. Safa, A., et al., *Targeted anticancer effects of Juglone-ZnO nanoparticles via cell cycle arrest and caspase-mediated apoptosis in colon cancer cells*. Scientific Reports, 2025. **16**(1): p. 1513.
143. Khan, A.A., et al., *Potential cytotoxicity of silver nanoparticles: Stimulation of autophagy and mitochondrial dysfunction in cardiac cells*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021. **28**(5): p. 2762-2771.
144. Masselli, E., et al., *ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(14).
145. Macovei, I., et al., *Green Synthesis of Bioactive Silver Nanoparticles from Fagopyrum esculentum Hulls*. Pharmaceutics, 2025. **17**(9).
146. Akhter, M.S., et al., *RETRACTED: A systematic review on green synthesis of silver nanoparticles using plants extract and their bio-medical applications*. Heliyon, 2024. **10**(11).
147. Sharma, N.K., et al., *Green Route Synthesis and Characterization Techniques of Silver Nanoparticles and Their Biological Adeptness*. ACS Omega, 2022. **7**(31): p. 27004-27020.
148. Hung, L.W., et al., *Acetylcholinesterase: Structure, dynamics, and interactions with organophosphorus compounds*. Protein Sci, 2025. **34**(10): p. e70297.

149. Lionetto, M.G., et al., *Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives*. BioMed Research International, 2013. **2013**(1): p. 321213.
150. Ling, X., et al., *Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water*. Environmental Technology, 2011. **32**(13): p. 1463-1470.
151. Lei, H., et al., *An overview of the direct interaction of synthesized silver nanostructures and enzymes*. International Journal of Biological Macromolecules, 2024. **279**: p. 135154.
152. Tareq, M., et al., *Dose-dependent biological toxicity of green synthesized silver nanoparticles in rat's brain*. Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 22642.
153. Jahan, I., et al., *The Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) on Thermophilic Bacteria: Antibacterial, Morphological, Physiological and Biochemical Investigations*. Microorganisms, 2024. **12**(2): p. 402.
154. Ahamed, M.S., et al., *Exploring Green-Synthesized Silver Nanoparticles in Neurodegeneration: a Systematic Review of Cholinesterase Enzyme Interactions*. Molecular Neurobiology, 2026. **63**(1): p. 393.
155. Renganathan, S., et al., *Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of Silver Nanoparticles Biosynthesized from Bauhinia tomentosa Linn*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(12).
156. Khatoon, A., et al., *Silver nanoparticles from leaf extract of Mentha piperita: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity*. Life Sciences, 2018. **209**: p. 430-434.
157. Chung, D.D.L., *Carbon Materials : Science And Applications*. 2019: World Scientific Publishing Company.
158. Dong, X., et al., *Application of Lignin-Derived Carbon Materials in Adsorption and Separation*. Separations, 2025. **12**(4): p. 88.
159. Zheng, Y., et al., *Recent Advances in Carbon-Based Catalysts for Heterogeneous Asymmetric Catalysis*. Molecules, 2025. **30**(12): p. 2643.
160. Ni, J. and Y. Li, *Carbon Nanomaterials in Different Dimensions for Electrochemical Energy Storage*. Advanced Energy Materials, 2016. **6**(17): p. 1600278.
161. Barra, A., et al., *Green Carbon Nanostructures for Functional Composite Materials*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(3): p. 1848.
162. Meng, L., et al., *Study on the Mechanism and Modification of Carbon-Based Materials for Pollutant Treatment*. Materials (Basel), 2025. **18**(23).
163. Wang, X., et al., *Key factors and primary modification methods of activated carbon and their application in adsorption of carbon-based gases: A review*. Chemosphere, 2022. **287**: p. 131995.
164. Bläker, C., et al., *Characterization of Activated Carbon Adsorbents – State of the Art and Novel Approaches*. ChemBioEng Reviews, 2019. **6**(4): p. 119-138.
165. <https://iupac.org/>, pristupljeno 29.07.2026.
166. Ferrando-Soria, J. and A. Fernandez, *Integrating Levels of Hierarchical Organization in Porous Organic Molecular Materials*. Nano-Micro Letters, 2024. **16**(1): p. 88.
167. Boehm, H.-P., *Chapter Thirteen - Surface Chemical Characterization of Carbons from Adsorption Studies*, in *Adsorption by Carbons*, E.J. Bottani and J. M.D. Tascón, Editors. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 301-327.
168. Intan, N.N. and J. Pfaendtner, *Composition of Oxygen Functional Groups on Graphite Surfaces*. The Journal of Physical Chemistry C, 2022. **126**(26): p. 10653-10667.

169. Xiao, S.X., C.S. Huang, and Y.L. Li, *Chapter 16 - Carbon Materials*, in *Modern Inorganic Synthetic Chemistry (Second Edition)*, R. Xu and Y. Xu, Editors. 2017, Elsevier: Amsterdam. p. 429-462.
170. Georgakilas, V., et al., *Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications*. Chemical Reviews, 2012. **112**(11): p. 6156-6214.
171. Shetty, A., et al., *Biomass-Derived Carbon Materials in Heterogeneous Catalysis: A Step towards Sustainable Future*. Catalysts, 2023. **13**(1): p. 20.
172. Selvaraj, P.S., et al., *Hydrothermal carbonization approach for transforming biomass waste to value added hydrochar and its applications in water remediation*. Desalination and Water Treatment, 2025. **322**: p. 101199.
173. Bui, T.-S., N.V. Long, and H. Nguyen, *The development of biomass-derived carbon-based photocatalysts for the visible-light-driven photodegradation of pollutants: a comprehensive review*. RSC Advances, 2021. **11**: p. 30574-30596.
174. Do Minh, T., et al., *Biochar based catalysts for the abatement of emerging pollutants: A review*. Chemical Engineering Journal, 2020. **394**: p. 124856.
175. Ahmad, A., et al., *Biomass-Based Activated Carbon*. 2024.
176. Sharma, S., et al., *Sustainable applications of biowaste-derived carbon dots in eco-friendly technological advancements: A review*. Materials Science and Engineering: B, 2024. **305**: p. 117414.
177. Milanković, V., et al., *Spent coffee grounds-derived carbon material as an effective adsorbent for removing multiple contaminants from wastewater: A comprehensive kinetic, isotherm, and thermodynamic study*. Journal of Water Process Engineering, 2024. **63**: p. 105507.
178. Ioannidou, O. and A. Zabaniotou, *Agricultural residues as precursors for activated carbon production—A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2007. **11**(9): p. 1966-2005.
179. Batidzirai, B., E.M.W. Smeets, and A.P.C. Faaij, *Harmonising bioenergy resource potentials—Methodological lessons from review of state of the art bioenergy potential assessments*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012. **16**(9): p. 6598-6630.
180. Jackowski, M., et al., *Brewer's Spent Grains—Valuable Beer Industry By-Product*. Biomolecules, 2020. **10**(12): p. 1669.
181. Heriyanto, et al., *Novel upcycling of mixed textile waste into valuable activated carbon: A circular economy solution*. Resources, Conservation and Recycling, 2025. **223**: p. 108526.
182. Zhou, C. and Y. Wang, *Recent progress in the conversion of biomass wastes into functional materials for value-added applications*. Sci Technol Adv Mater, 2020. **21**(1): p. 787-804.
183. Fahmy, T.Y.A., et al., *Biomass pyrolysis: past, present, and future*. Environment, Development and Sustainability, 2020. **22**(1): p. 17-32.
184. Benhadj, M., et al., *From lignocellulosic biomass to activated carbon: Impact of composition, structure and activation on the adsorption of organic pollutants*. Scientific African, 2026. **31**: p. e03249.
185. Tekin, K., S. Karagöz, and S. Bektaş, *A review of hydrothermal biomass processing*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014. **40**: p. 673-687.
186. Nazari, L., C. Xu, and M. Ray, *Advanced Technologies (Biological and Thermochemical) for Waste-to-Energy Conversion*. 2021. p. 55-95.
187. Tripathi, M., J.N. Sahu, and P. Ganesan, *Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016. **55**: p. 467-481.

188. Tomczyk, A., Z. Sokołowska, and P. Boguta, *Biochar physicochemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2020. **19**(1): p. 191-215.
189. Weber, K. and P. Quicker, *Properties of biochar*. Fuel, 2018. **217**: p. 240-261.
190. Yin, J., et al., *Synthesis Strategies of Porous Carbon for Supercapacitor Applications*. Small Methods, 2020. **4**(3): p. 1900853.
191. Hupian, M., et al., *Activated carbon treated with different chemical agents for pertechnetate adsorption*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2024. **333**(4): p. 1815-1829.
192. Wang, L., et al., *Synthesis and applications of biomass-derived porous carbon materials in energy utilization and environmental remediation*. Chemosphere, 2023. **339**: p. 139635.
193. Tyagi, A., et al., *Biowaste derived activated carbon electrocatalyst for oxygen reduction reaction: Effect of chemical activation*. International Journal of Hydrogen Energy, 2020. **45**(34): p. 16930-16943.
194. Barakat, N.A.M., O.M. Irfan, and H.M. Moustafa, *H₃PO₄/KOH Activation Agent for High Performance Rice Husk Activated Carbon Electrode in Acidic Media Supercapacitors*. Molecules, 2023. **28**(1): p. 296.
195. Elmouwahidi, A., et al., *Activated carbons from KOH and H₃PO₄-activation of olive residues and its application as supercapacitor electrodes*. Electrochimica Acta, 2017. **229**: p. 219-228.
196. Pérez-Román, B., et al., *Nitrogen-doped porous carbon materials: synthetic pathways, structural tuning, and functional applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2026. **551**: p. 217330.
197. Gao, Y., et al., *Insight into activated carbon from different kinds of chemical activating agents: A review*. Science of The Total Environment, 2020. **746**: p. 141094.
198. Neme, I., G. Gonfa, and C. Masi, *Activated carbon from biomass precursors using phosphoric acid: A review*. Heliyon, 2022. **8**(12).
199. Soltani, N., et al., *Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials*. Chemical Engineering Journal, 2015. **264**: p. 899-935.
200. Branton, P. and R.H. Bradley, *Effects of active carbon pore size distributions on adsorption of toxic organic compounds*. Adsorption, 2011. **17**(2): p. 293-301.
201. Solcova, O., M. Dlaskova, and F. Kastanek, *Innovative Sorbents for the Removal of Micropollutants from Water*. Molecules, 2025. **30**(7): p. 1444.
202. Akhter, P., et al., *Recent advances in activated carbon-based materials: Potential efficacy for removal of contaminants from wastewater: a critical review*. Biomass Conversion and Biorefinery, 2026. **16**(7): p. 196.
203. Hu, X., et al., *Waste Biomass-Derived Carbon with Ultrahigh Adsorption Capacity for Anionic and Cationic Dyes and Antibiotics in a Wide pH Range*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2024. **63**(10): p. 4702-4713.
204. Milanković, V., et al., *Spent Coffee Grounds as an Adsorbent for Malathion and Chlorpyrifos—Kinetics, Thermodynamics, and Eco-Neurotoxicity*. Foods, 2023. **12**(12): p. 2397.
205. Milanković, V., et al., *The adsorption of chlorpyrifos and malathion under environmentally relevant conditions using biowaste carbon materials*. Journal of hazardous materials, 2024. **480**: p. 135940.
206. Kuang, Y., X. Zhang, and S. Zhou, *Adsorption of Methylene Blue in Water onto Activated Carbon by Surfactant Modification*. Water, 2020. **12**(2): p. 587.

207. Bazan-Wozniak, A., et al., *A Study on the Adsorption of Rhodamine B onto Adsorbents Prepared from Low-Carbon Fossils: Kinetic, Isotherm, and Thermodynamic Analyses*. *Molecules*, 2024. **29**(6): p. 1412.
208. Raji, Y., et al., *High adsorption capacities of crystal violet dye by low-cost activated carbon prepared from Moroccan Moringa oleifera wastes: Characterization, adsorption and mechanism study*. *Diamond and Related Materials*, 2023. **135**: p. 109834.
209. Anbia, M. and A. Ghaffari, *Removal of malachite green from dye wastewater using mesoporous carbon adsorbent*. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2011. **8**(1): p. S67-S76.
210. Dominguez, M., J. Mendoza, and K. Figueroa, *Adsorption of methylene blue dye using common walnut shell (Juglans regia) like biosorbent: implications for wastewater treatment*. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 2024. **17**(1): p. 2362257.
211. Shah, J., et al., *Removal of Rhodamine B from aqueous solutions and wastewater by walnut shells: kinetics, equilibrium and thermodynamics studies*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2013. **7**(4): p. 428-436.
212. Zhao, Y., et al., *Insights into enhanced adsorptive removal of Rhodamine B by different chemically modified garlic peels: Comparison, kinetics, isotherms, thermodynamics and mechanism*. *Journal of Molecular Liquids*, 2019. **293**: p. 111516.
213. Yetgin, S. and M. Amlani, *Agricultural low-cost waste adsorption of methylene blue and modelling linear isotherm method versus nonlinear prediction*. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2025. **27**(3): p. 1205-1225.
214. Phuc, L., et al., *Adsorption of crystal violet dye by biochar made from coffee ground*. *E3S Web of Conferences*, 2025. **626**.
215. Ardiyanti, A. and S.-S. Ni'mah, -Yatim-Lailun, *Malachite Green Adsorption Using Carbon-Based and Non-Conventional Adsorbent Made from Biowaste and Biomass: A Review*. *Journal of Renewable Materials*, 2023. **11**(11): p. 3789--3806.
216. Gupta, A., et al., *Dye-laden sludge-derived biochar for wastewater remediation: A review on pyrolytic engineering, adsorptive interactions, and environmental prospects*. *Sustainable Chemistry for the Environment*, 2025. **11**: p. 100271.
217. Gürses, A., et al., *Dyes and Pigments: Their Structure and Properties*, in *Dyes and Pigments*, A. Gürses, et al., Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 13-29.
218. Ali, A.N., *A comprehensive study of natural and synthetic dyes: their properties, methods of preparation, and uses*. *SHIFAA*, 2024. **2024**: p. 1-17.
219. Alegbe, E.O. and T.O. Uthman, *RETRACTED: A review of history, properties, classification, applications and challenges of natural and synthetic dyes*. *Heliyon*, 2024. **10**(13).
220. Azanaw, A., et al., *Textile effluent treatment methods and eco-friendly resolution of textile wastewater*. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2022. **6**: p. 100230.
221. Kouda, I., et al., *Enhanced cationic dyes adsorption: Experimental and theoretical insights into Moroccan clays vs. commercial montmorillonite*. *Surfaces and Interfaces*, 2025. **59**: p. 105946.
222. Gayathri, K., et al., *Microbial Innovations for Sustainable Wastewater Management: A Comprehensive Review of Azo Dye Bioremediation*. *Sustainability*, 2026. **18**(6): p. 3041.
223. Lin, J., et al., *Environmental impacts and remediation of dye-containing wastewater*. *Nature Reviews Earth & Environment*, 2023. **4**(11): p. 785-803.
224. Cai, D., et al., *Intermolecular interactions in mixed dye systems and the effects on dye wastewater treatment processes*. *RSC Advances*, 2024. **14**(1): p. 373-381.

225. Gürses, A., et al., *Classification of Dye and Pigments*, in *Dyes and Pigments*, A. Gürses, et al., Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 31-45.
226. Khan, I., et al., *Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation*. Water, 2022. **14**(2): p. 242.
227. Haleem, A., et al., *In-Depth Photocatalytic Degradation Mechanism of the Extensively Used Dyes Malachite Green, Methylene Blue, Congo Red, and Rhodamine B via Covalent Organic Framework-Based Photocatalysts*. Water, 2024. **16**(11): p. 1588.
228. Mani, S. and R.N. Bharagava, *Exposure to Crystal Violet, Its Toxic, Genotoxic and Carcinogenic Effects on Environment and Its Degradation and Detoxification for Environmental Safety*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237*, W.P. de Voogt, Editor. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 71-104.
229. Oladoye, P.O., et al., *Methylene blue dye: Toxicity and potential elimination technology from wastewater*. Results in Engineering, 2022. **16**: p. 100678.
230. Yusuf, T.L., et al., *The application of photoelectrocatalysis in the degradation of rhodamine B in aqueous solutions: a review*. RSC Advances, 2022. **12**(40): p. 26176-26191.
231. Kamal, A.-b., et al., *Developing a cost-effective and eco-friendly adsorbent/photocatalyst using biomass and urban waste for crystal violet removal and antimicrobial applications*. Biomass Conversion and Biorefinery, 2025. **15**(7): p. 10089-10107.
232. Mittal, A., et al., *Adsorption of hazardous dye crystal violet from wastewater by waste materials*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **343**(2): p. 463-473.
233. Bian, Y., et al., *Malachite green in environmental samples: Updates on sources, fates, distribution and removal techniques*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2025. **303**: p. 118978.
234. Sharma, J., S. Sharma, and V. Soni, *Toxicity of malachite green on plants and its phytoremediation: A review*. Regional Studies in Marine Science, 2023. **62**: p. 102911.
235. Hanafi, M.F. and N. Sapawe, *A review on the current techniques and technologies of organic pollutants removal from water/wastewater*. Materials Today: Proceedings, 2020. **31**: p. A158-A165.
236. Tang, K.H.D., et al., *Biological Removal of Dyes from Wastewater: A Review of Its Efficiency and Advances*. Tropical Aquatic and Soil Pollution, 2022. **2**(1): p. 59-75.
237. Alsukaibi, A.K.D., *Various Approaches for the Detoxification of Toxic Dyes in Wastewater*. Processes, 2022. **10**(10): p. 1968.
238. Moradihamedani, P., *Recent advances in dye removal from wastewater by membrane technology: a review*. Polymer Bulletin, 2022. **79**(4): p. 2603-2631.
239. Wong, P.W., T.T. Teng, and N.A.R.N. Norulaini, *Efficiency of the Coagulation-Flocculation Method for the Treatment of Dye Mixtures Containing Disperse and Reactive Dye*. Water Quality Research Journal, 2007. **42**(1): p. 54-62.
240. Agarwala, R. and L. Mulky, *Adsorption of Dyes from Wastewater: A Comprehensive Review*. ChemBioEng Reviews, 2023. **10**(3): p. 326-335.
241. Araya-Sibaja, A.M., et al., *Spent Coffee Ground-Based Materials Evaluated by Methylene Blue Removal*. Processes, 2025. **13**(5): p. 1592.
242. Mussa, Z.H., et al., *A comprehensive review on adsorption of methylene blue dye using leaf waste as a bio-sorbent: isotherm adsorption, kinetics, and thermodynamics studies*. Environmental Monitoring and Assessment, 2023. **195**(8): p. 940.

243. Li, X., J. Shi, and X. Luo, *Enhanced adsorption of rhodamine B from water by Fe-N co-modified biochar: Preparation, performance, mechanism and reusability*. Bioresource Technology, 2022. **343**: p. 126103.
244. Sowndarya, S. and C. Ramprasad, *Comparative evaluation of agricultural waste derived agrochar in removing Rhodamine B from aqueous solutions*. Discover Sustainability, 2026. **7**(1): p. 786.
245. Mehta, D., P.N. Dave, and V.V. Kumar, *Toxic crystal violet dye removal by novel, eco-friendly seablite biochar–ferrite composite: adsorption isotherm, kinetics, and artificial neural network*. RSC Advances, 2025. **15**(40): p. 33189-33208.
246. Joshi, M., et al., *Simple adsorptive removal of crystal violet, a triarylmethane dye, from synthetic wastewater using Fe (III)-treated pine needle biochar*. Environmental Monitoring and Assessment, 2023. **195**(4): p. 444.
247. Tsai, C.-Y., et al., *Engineered mesoporous biochar derived from rice husk for efficient removal of malachite green from wastewaters*. Bioresource Technology, 2022. **347**: p. 126749.
248. Ganguly, P., R. Sarkhel, and P. Das, *Synthesis of pyrolyzed biochar and its application for dye removal: Batch, kinetic and isotherm with linear and non-linear mathematical analysis*. Surfaces and Interfaces, 2020. **20**: p. 100616.
249. Anisuzzaman, S.M., et al., *Current Trends in the Utilization of Photolysis and Photocatalysis Treatment Processes for the Remediation of Dye Wastewater: A Short Review*. ChemEngineering, 2022. **6**(4): p. 58.
250. Dąbrowski, A., *Adsorption — from theory to practice*. Advances in Colloid and Interface Science, 2001. **93**(1): p. 135-224.
251. Artioli, Y., *Adsorption*, in *Encyclopedia of Ecology*, S.E. Jørgensen and B.D. Fath, Editors. 2008, Academic Press: Oxford. p. 60-65.
252. Aljamali, N., R. Khdur, and I. Alfatlawi, *Physical and Chemical Adsorption and its Applications*. 2021. **7**: p. 1-8.
253. Tan, K.L. and B.H. Hameed, *Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017. **74**: p. 25-48.
254. Pooresmaeil, M. and H. Namazi, *Application of polysaccharide-based hydrogels for water treatments*. 2020. p. 411-455.
255. Saleh, T.A., *Chapter 3 - Kinetic models and thermodynamics of adsorption processes: classification*, in *Interface Science and Technology*, T.A. Saleh, Editor. 2022, Elsevier. p. 65-97.
256. Lagergren, S. *About the Theory of So-Called Adsorption of Soluble Substances*.
257. Ho, Y.S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. Process Biochemistry, 1999. **34**(5): p. 451-465.
258. Weber, W.J. and J.C. Morris, *Kinetics of Adsorption on Carbon from Solution*. Journal of the Sanitary Engineering Division, 1963. **89**(2): p. 31-59.
259. Wang, J. and X. Guo, *Adsorption isotherm models: Classification, physical meaning, application and solving method*. Chemosphere, 2020. **258**: p. 127279.
260. Al-Ghouti, M.A. and D.A. Da'ana, *Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review*. Journal of Hazardous Materials, 2020. **393**: p. 122383.
261. Foo, K.Y. and B.H. Hameed, *Insights into the modeling of adsorption isotherm systems*. Chemical Engineering Journal, 2010. **156**(1): p. 2-10.

262. Králik, M., *Adsorption, chemisorption, and catalysis*. Chemical Papers, 2014. **68**(12): p. 1625-1638.
263. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Curr Protoc Immunol, 2015. **111**: p. A3.b.1-a3.b.3.
264. Fenech, M., *The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1993. **285**(1): p. 35-44.
265. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en.html, pristupljeno 30.07.2026.
266. Surrallés, J., et al., *Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures*. Mutation Research/Genetic Toxicology, 1995. **341**(3): p. 169-184.
267. Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nature Protocols, 2006. **1**(3): p. 1112-1116.
268. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 1961. **7**(2): p. 88-95.
269. Chandwadkar, H.S., et al., *Revisiting galvanic replacement between silver nanoparticles and mercury(II) ions in a cellulose membrane intended for optical assay application: Some new insights into silver-mercury interaction*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2020. **602**: p. 125140.
270. Sadeghi-Kiakhani, M., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles on polyamide fabrics using Scrophularia striata Boiss extract: Characterization, dyeing, and antibacterial properties*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2025. **145**: p. 732-744.
271. Swinehart, D.F., *The beer-lambert law*. Journal of chemical education, 1962. **39**(7): p. 333.
272. Singh, S., A. Bharti, and V.K. Meena, *Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles*. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 2014. **25**(9): p. 3747-3752.
273. Heydaryan, K., *Facile chemical reduction synthesis of silver nanoparticles: influence of reaction parameters on structure and antibacterial properties*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2026. **117**(2): p. 22.
274. Pasiieczna-Patkowska, S., M. Cichy, and J. Flieger, *Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in Characterization of Green Synthesized Nanoparticles*. Molecules, 2025. **30**(3): p. 684.
275. Gwada, C.A., et al., *Phytochemical-assisted synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles for antimicrobial activity*. RSC Adv, 2025. **15**(18): p. 14170-14181.
276. Encinas-Gimenez, M., P. Martin-Duque, and A. Martín-Pardillos, *Cellular Alterations Due to Direct and Indirect Interaction of Nanomaterials with Nucleic Acids*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(4): p. 1983.
277. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Nature Protocols, 2007. **2**(5): p. 1084-1104.
278. Kirsch-Volders, M., et al., *Report from the in vitro micronucleus assay working group*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003. **540**(2): p. 153-163.
279. Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 2004: John Wiley & Sons.

280. Ilić, M., et al., *Surface functional groups and degree of carbonization of selected chars from different processes and feedstock*. PLoS One, 2022. **17**(11): p. e0277365.
281. Phan, H.H. and A.N. Phan, *Amorphous Carbon with a Graphitic Pattern Derived from Biomass for Supercapacitor Applications*, in *Biomass-Based Functional Carbon Nanostructures for Supercapacitors*, S.K. Tiwari, M. Bystrzejewski, and V. Kumar, Editors. 2023, Springer Nature Singapore: Singapore. p. 179-221.
282. Schweidler, S., et al., *Volume Changes of Graphite Anodes Revisited: A Combined Operando X-ray Diffraction and In Situ Pressure Analysis Study*. The Journal of Physical Chemistry C, 2018. **122**(16): p. 8829-8835.
283. Shi, Z., et al., *Bio-based anode material production for lithium-ion batteries through catalytic graphitization of biochar: the deployment of hybrid catalysts*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 3966.
284. Hernández-Rentero, C., et al., *Alternative lithium-ion battery using biomass-derived carbons as environmentally sustainable anode*. Journal of Colloid and Interface Science, 2020. **573**: p. 396-408.
285. Polowczyk, I., A. Bastrzyk, and M. Fiedot, *Protein-Mediated Precipitation of Calcium Carbonate*. Materials (Basel), 2016. **9**(11).
286. Lazarević-Pašti, T., et al., *Porous Carbon Materials for Organophosphate Removal—Implications for Long-Term Neurotoxicity Exposure*. C, 2026. **12**(1): p. 25.

PRILOZI

Biografija autora

Nevena Radivojević je rođena 10.10.1997, godine u Kragujevcu, Osnovnu i srednju školu (Prva kragujevačka gimnazija) završila je u Kragujevcu. Osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Kragujevcu upisala je školske 2016/17, godine, studijski program Hemija. Diplomski rad pod naslovom „Toksični efekti i upotreba botulinum toksina“ odbranila je školske 2020/21, godine i stekla zvanje Diplomirani hemičar za istraživanje i razvoj. Osnovne akademske studije završila je sa prosečnom ocenom 8,64 (osam i 64/100) i ocenom 10 na diplomskom radu pod mentorstvom docenta dr Vladimira Mihailovića. Iste školske godine upisala je master studije na studijskom programu Biohemija, na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu. Master rad pod naslovom „Razvoj ELISA testa za određivanje nivoa serumskih IgG antitela specifičnih za receptor-vezujući domen S proteina SARS-CoV-2“ odbranila je školske 2021/22, godine na Katedri za biohemiju sa ocenom 10 i prosečnom ocenom 9, i stekla zvanje Master biohemičar. Eksperimentalni deo master rada urađen je pod mentorstvom dr Marijane Stojanović na Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“. Doktorske akademske studije na studijskom programu Biohemija upisala je školske 2021/22, godine i položila sve ispite predviđene planom i programom, sa prosekom 9,5 (devet i 50/100).

Od 08.06.2022. Nevena Radivojević zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ - Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Angažovana je na istraživačkoj temi „Razvoj održivih integrisanih procesa za izolaciju raznovrsnih jedinjenja primenom inovativnih rešenja u skladu sa principima zelene hemije“.

Kandidatkinja Nevena Radivojević bavi se naučno-istraživačkim radom iz oblasti novih materijala, nano nauke i biohemije. Dosadašnji rad kandidatkinje bazirao se na karakterizaciji i primeni zelenosintetisanih nanočestica srebra u *in vitro* istraživanjima, kao i sintezi i karakterizaciji ugljeničnih materijala i njihovoj primeni u zaštiti životne sredine.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Nevena Radivojević

broj indeksa DB03/2021

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Sinteza i karakterizacija nanomaterijala dobijenih korišćenjem *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum* za primenu u tretmanu zagađenih voda

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica,

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nevena Radivojević

Broj indeksa: DB03/2021

Studijski program: Doktorske akademske studije biohemija

Naslov rada: Sinteza i karakterizacija nanomaterijala dobijenih korišćenjem Saintpaulia ionantha, Juglans regia i Allium sativum za primenu u tretmanu zagađenih voda

Mentori: dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor

dr Vedran Milanković, viši naučni saradnik

Potpisani/a Nevena Radivojević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu,

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada,

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu,

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Sinteza i karakterizacija nanomaterijala dobijenih korišćenjem *Saintpaulia ionantha*, *Juglans regia* i *Allium sativum* za primenu u tretmanu zagađenih voda

koja je moje autorsko delo,

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje,

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la,

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista,

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.