

Nova kvarterna amonijeva sol kao antimikrobni agens i aktivna komponenta potenciometrijskog senzora za tenzide

Tot, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:510240>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Dora Tot

Nova kvarterna amonijeva sol kao antimikrobni agens
i aktivna komponenta potenciometrijskog senzora za
tenzide

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Dora Tot

Nova kvarterna amonijeva sol kao antimikrobni agens
i aktivna komponenta potenciometrijskog senzora za
tenzide

Diplomski rad

Mentorica : doc. dr. sc. Marija Jozanović

Komentor : izv. prof. dr. sc. Nikola Sakač

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****NOVA KVARTERNA AMONIJEVA SOL KAO ANTIMIKROBNI AGENS I
AKTIVNA KOMPONENTA POTENCIOMETRIJSKOG SENZORA ZA TENZIDE****Dora Tot****Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Mentor:** doc. dr. sc. Marija Jozanović**Komentor:** izv. prof. dr. sc. Nikola Sakač

Sažetak: Nova kvarтерна amonijeva sol (QAC) - kationski tenzid 2-metil-1,3-dioktadecilbenzo[d]imidazol (MDBI) korišten je kao protu-ion u ionoforu za izradu i testiranje potenciometrijskog senzora za tenzide i kao antimikrobni agens. Kationski tenzidi često imaju antimikrobna svojstva i primjenjuju se kao antiseptici i dezinficijensi. Najnoviji primjer su dezinficijensi za suzbijanje širenja SARS-CoV-2 virusa na bazi QAC-ova ili alkohola. Ionofor za senzor za tenzide na bazi PVC tekuće membrane bio je MDBI s terefenilborat (TPB) protu-ionom. Senzor je uspješno izrađen i okarakteriziran te testiran na modelnim sustavima i realnim sustavima otpadnih voda i komercijalnih proizvoda. Antimikrobno djelovanje MDBI uspoređeno je s komercijalnim sredstvom za čišćenje kupaonica koji sadrži kationski tenzid (Cilit BANG®) na 5 sojeva mikroorganizama gdje je kao hranjiva podloga za bakterije korišten Mueller – Hinton agar, a za kvasce i plijesni Sabouraud agar. Ispitivani mikroorganizmi su: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* te *Candida albicans*. Izmjerene su njihove zone inhibicije. Usporedbom zona inhibicije za MDBI i Cilit BANG®, MDBI je pokazao superiornost u inhibiciji *Pseudomonas aeruginosa* koji je rezistentan na uobičajne antimikrobne agense.

Diplomski rad obuhvaća: 46 stranica, 32 slike, 7 tablica, 20 literaturnih navoda**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** tenzidi / kvarterne amonijeve soli / tenzidni senzor / antibakterijska svojstva**Rad prihvaćen:** 25.10.2022.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, predsjednik
2. doc. dr. sc. Marija Jozanović, komentorica i članica
3. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, članica
4. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, zamjena člana

Rad je pohranjen u : Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

Josipa Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

**NEW QUATERNARY AMMONIUM SALT AS ANTIMICROBIAL AGENT AND
ACTIVE COMPONENT OF POTENTIOMETRIC SENSOR FOR TENSIDES**

Dora Tot

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: doc. dr. sc. Marija Jozanović

Co-Supervisor: izv. prof. dr. sc. Nikola Sakač

Abstract: A new quaternary ammonium salt (QAC) - cationic surfactant 2-methyl-1,3-dioctadecyl-benzo[*d*]imidazole (MDBI) was used as a counterion in an ionophore for making and testing a potentiometric sensor for surfactants and as an antimicrobial agent. Cationic surfactants often have antimicrobial properties so they are used as antiseptics and disinfectants. The most recent example are disinfectants based on QACs or alcohol which are used for controlling the spread of the SARS-CoV-2 virus. The ionophore for the surfactant sensor based on PVC liquid membrane was MDBI with terephenylborate (TPB) as the counterion. The sensor was successfully manufactured, characterized, and tested on model systems, real wastewater systems, and commercial products. The antimicrobial activity of MDBI was tested and compared with a commercial bathroom cleaner containing a cationic surfactant (Cilit BANG[®]) on 5 strains of microorganisms, where Mueller-Hinton agar was used as a growth medium for bacteria, and Sabouraud agar was used for yeasts and molds. The observed microorganisms were: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. Their zones of inhibition were measured. By comparing the zones of inhibition for MDBI and Cilit BANG[®], MDBI showed superiority in the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*, which is resistant to common antimicrobial agents.

Thesis includes: 46 pages, 32 figures, 7 tables, 20 references

Original in: Croatian

Keyword: tensides / quaternary ammonium salts / tenside sensor / antimicrobial properties

Thesis accepted: 25.10.2022.

Reviewers:

1. assist. prof. Aleksandar Sečenji PhD, chair
2. assist. prof. Marija Jozanović PhD, co-supervisor and member
3. assist. prof. Martina Šrajer Gajdošik PhD, member
4. associate. prof. Mirela Samardžić PhD, substitute member

Thesis deposited in: Library of Department of Chemistry, Kuhačeva 20, Osijek

Zahvala

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem mentorima doc. dr. sc. Mariji Jozanović i izv. prof. dr. sc. Nikoli Sakač zbog uloženog truda, prenesenog znanja, strpljenja i vremena za moje brojne upite tokom izrade diplomskog rada te podrške i vjere u mene.

Također, zahvaljujem se svim članovima Laboratorija Međimurskih voda, posebno voditeljici laboratorija mr. sc. Nadi Glumac na ustupljenom prostoru, vremenu, prenesenom znanju te ljubaznosti i prijateljskoj atmosferi.

Veliko hvala svim kolegama i prijateljima na fakultetu koji su uvijek bili uz mene, od samog početka te učinili moj boravak u Osijeku i tijekom studiranja lakšim i zabavnijim.

Na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji, a najveću zaslugu za moje postignuće prepisujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu uz mene, bez obzira da li to bili teški ili sretni trenuci.

Bez vas sve što sam postigla ne bi bilo moguće. Veliko hvala svima!

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	2
2.1. Tenzidi	2
2.1.1. Podjela tenzida.....	3
2.1.1.1. Anionski tenzidi	4
2.1.1.2. Kationski tenzidi	5
2.1.1.3. Neionski tenzidi.....	6
2.1.1.4. Amfolitski tenzidi.....	6
2.1.2. Primjena tenzida	6
2.2. Kvarterni amonijevi spojevi QACs.....	7
2.2.1. QAC spojevi kao antimikrobni agensi	8
2.2.2. Primjena QAC spojeva	9
2.2.3. QAC spojevi benzimidazola.....	10
2.3. Potenciometrija	10
2.3.1. Indikatorske elektrode	12
2.3.1.1. Ion - selektivne elektrode	12
2.3.1.2. Princip rada senzora	14
2.3.1.3. Ionofor.....	15
3. Eksperimentalni dio.....	16
3.1. Kemikalije.....	16
3.2. Sinteza QAC-TPB.....	17
3.3. Izrada tenzidnog senzora i aparatura	18
3.1.1. Izrada tenzidnog senzora.....	18
3.1.2. Aparatura.....	19
3.4. Potenciometrijska karakterizacija tenzidnog senzora	20
3.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	21
3.5.1. Metoda	21
3.5.2. Mikroorganizmi	22
3.5.3. Eksperimentalni dio	22
4. Rezultati i rasprava.....	22
4.1. Odziv tenzidnog senzora.....	22
4.2. Titracije modelnih uzoraka	23
4.3. Titracije realnih uzoraka	26

4.4. Potenciometrijska titracija komercijalnih proizvoda	29
4.5. Provjera antimikrobne aktivnosti	31
5. Zaključak	35
6. Literatura	36
7. Životopis	38

1. Uvod

Površinski aktivne tvari, surfaktanti ili tenzidi su bifunkcionalne organske molekule koje zbog svoje strukture pronalaze brojnu primjenu u svakodnevnom životu. Primjenjuju se u industriji (tekstilna, biotehnoška, farmaceutska) i u kućanstvu kao sredstva za čišćenje, pranje, osobnu higijenu i kozmetiku. Dijele se na anionske, kationske, neionske i amfolitske. Proizvodnja površinski aktivnih tvari raste svake godine, prosječna godišnja stopa rasta (CAGR) između 2016. i 2021. godine iznosi 5,4%. [1] Zbog široke proizvodnje i primjene dolazi do prezasićenja u okolišu što dovodi do akumulacije u tlo, potoke, biljke, životinje i mikroorganizme. Zbog negativnog utjecaja tenzida na okoliš, potrebna je kontrola i razvoj novih senzora koji omogućuju točna, pouzdana i brza mjerenja na licu mjesta. [1]

Potencimetrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na mjerenju razlike potencijala sustava elektroda. Potencimetrijski sustav sastoji se od dvije elektrode, referentne i indikatorske. Kao tenzidni senzori služe ion–selektivne elektrode sa tekućom PVC membranom i ionskim parom koji poboljšava selektivnost i samim time detektiranje. [2]

U ovom radu ispitivane su karakteristike tenzidne senzorske elektrode sa novim ionskim parom 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ijev tetrafenilboratom (MDBI-TPB).

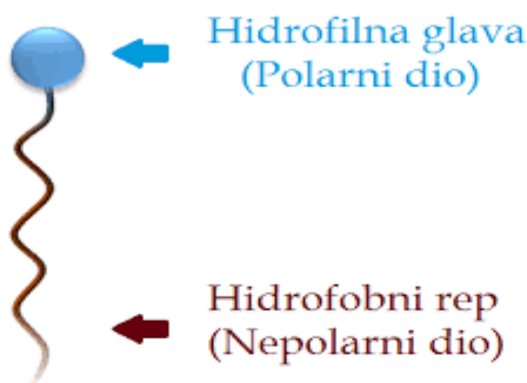
Kationski tenzidi često imaju antimikrobna svojstva stoga se primjenjuju kao antiseptici i dezinficijensi. Njihovim dugotrajnim korištenjem mikroorganizmi mogu razviti rezistenciju, zbog toga je potrebno sintetizirati nove vrste tenzida. Kvarterne amonijeve soli (eng. *quaternary ammonium* compounds, QACs) su vrsta kationskih tenzida. Primjenjuju se kao dezinficijensi zbog svojih antimikrobnih i antivirusnih svojstava. Tokom aktualne pandemije SARS-CoV-2 njihova proizvodnja se povećala zbog uspješnog suzbijanja virusa. [3]

U ovom radu ispitano je antimikrobno djelovanje novog 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazolijevog kationskog tenzida (MDBI) te je njegovo djelovanje uspoređeno sa komercijalnim sredstvom za čišćenje kupaonica koji sadrži kationski tenzid (Cilit BANG®) na 5 sojeva mikroorganizama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* te *Candida albicans*.

2. Literaturni pregled

2.1. Tenzidi

Površinski aktivne tvari (eng. *Surfactant*), surfaktanti ili tenzidi su bifunkcionalne, amfifilne organske molekule koje zbog svoje strukture imaju sposobnost promjene površinske napetosti otopina. U otopini se raspoređuju tako da je njihova koncentracija na graničnoj površini veća od koncentracije u unutrašnjosti otopine. Njihova struktura sastoji se od hidrofilne „glave“ i hidrofobnog „repa“, najčešće dugačkog ugljikovodičnog lanca (Slika 1). Glava je polarni dio molekule, koji se otapa u vodi i drugim polarnim otapalima, dok je rep nepolaran i ne otapa se u vodi, već u nepolarnim, organskim otapalima. [4]



Slika 1. Shematski prikaz molekule tenzida. Izvor:

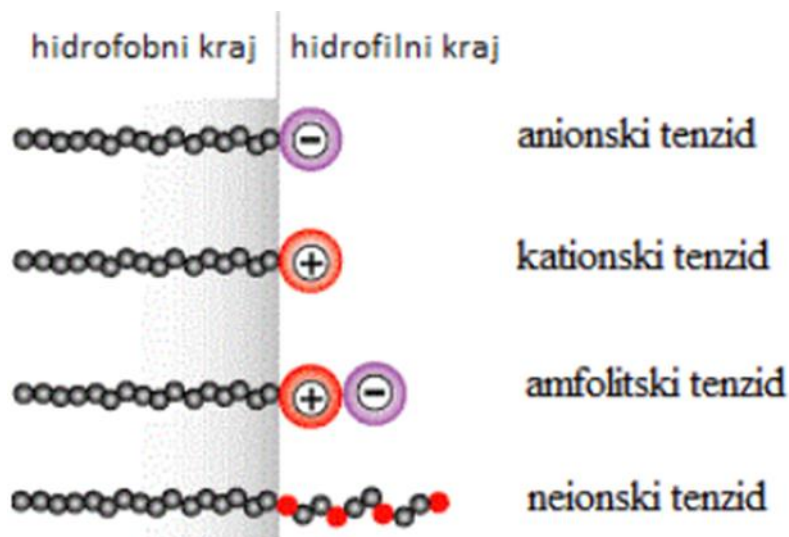
<http://www.bristol.ac.uk/chemistry/research/eastoe/what-are-surfactants/>

Osobine tenzida su samoudruživanje i adsorpcija. Samoudruživanje je tendencija molekula da se slažu u organizirane strukture, što u ovom slučaju znači formiranje micela, dvosloja ili tekućih kristala. Kod formiranja micela hidrofilne glave molekula tenzida otapaju se u vodi, a hidrofobni repovi ostaju izvan vode tj. formiraju krug u unutrašnjosti micela. Krična koncentracija za stvaranje micela ili CMC (eng. *Critical Micelle Concentration*) je minimalna koncentracija koja je potrebna za njihovo stvaranje. To je koncentracija do koje tenzidi u otopini mogu postojati kao monomeri. Kada se CMC premaši dolazi do samoudruživanja molekula tenzida. U jednoj miceli može se pronaći od nekoliko desetina do nekoliko stotina molekula tenzida. Također, drugo važno svojstvo tenzida je adsorpcija. Ova osobina predstavlja sklonost molekula skupljanju na granici dva sloja, najčešće ulja i vode ili zraka i vode. Kod adsorpcije na granici faza ulja i vode, molekula tenzida se svojim repom okreće prema ulju, a polarnom glavom prema vodi.

Ovakvim procesom dolazi do novih makroskopskih pojava kao što su pjenjenje, emulgiranje ili kvašenje. Prema polarnom djelu molekule tenzidi se klasificiraju na anionske, kationske, amfolitske i neionske. Molekule tenzida pronalaze široku primjenu u industriji (tekstilna, biotehnoška, farmaceutska) i u kućanstvu (deterdženti, osobna higijena, kozmetika). Proizvodnja površinski aktivnih tvari raste svake godine, prosječna godišnja stopa rasta (CAGR) između 2016. i 2021. godine iznosi 5,4%. Zbog široke proizvodnje i primjene dolazi do njihovog prezasićenja u okolišu. [1,4]

2.1.1. Podjela tenzida

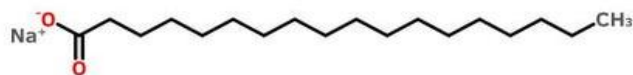
Prema vrsti naboja hidrofilne skupine tenzidi se mogu podijeliti na anionske, kationske, neionske i amfolitske (amfoterne) (Slika 2). Anionski tenzidi sadrže negativnu hidrofilnu skupinu i u vodi disociraju na površinski aktivan anion i kation. Kationski tenzidi imaju pozitivnu hidrofilnu skupinu i u vodi disociraju na površinski aktivan kation i anion. Amfolitski tenzidi sadrže i pozitivno i negativno nabijenu hidrofilnu skupinu a njihova disocijacija u vodi ovisi o pH-vrijednosti. Neionski tenzidi sadrže hidrofilne skupine koje neće disocirati u vodi i nemaju naboj. [4,5]



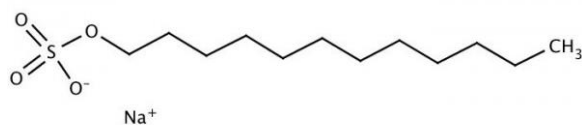
Slika 2. Shematski prikaz podjele tenzida.

2.1.1.1. Anionski tenzidi

Anionski tenzidi su sve površinski aktivne tvari kojima je hidrofilni dio molekule negativno nabijen (najčešće sulfati, sulfonati i karboksilati), a hidrofobni dio može biti linearni ili razgranati alkilni lanac, alkilbenzen ili alkilfenileter. Bilo koja negativno nabijena funkcionalna skupina koja može kompleksirati s protuionom može biti anionski surfaktant. Anionski tenzidi mogu se podijeliti prema kemijskoj strukturi lipofilnog dijela molekule. Prva grupa anionskih tenzida temelji se na alifatskim karboksilnim kiselinama. To su najčešće korišteni anionski tenzidi koji se mogu dobiti iz prirodnih životinjskih i biljnih masti. Masti kakve se javljaju u prirodi su obično triesteri karboksilnih kiselina i glicerola. Te masti se mogu hidrolizirati pomoću kalijevog ili natrijevog hidroksida, procesom koji se naziva saponifikacija. Kao produkt nastaje sapun, anionski surfaktant, koji se sastoji od kalijeve ili natrijeve soli karboksilne kiseline. Druga grupa anionskih tenzida temelji se na sulfonskim kiselinama. Jedan od najvažnijih tenzida ove klase je natrijev dodecil sulfat. Obično se koristi u biologiji i biokemiji za denaturaciju proteina te je važan preduvjet za gel elektroforezu. Fluorirani anionski tenzidi također su pronašli svoju primjenu, npr. kao aditiv za odbijanje mrlja u tkanini. Fluorirane površinski aktivne tvari obično su nepovoljne za okoliš jer je njihovo vrijeme poluraspada vrlo kratko i imaju tendenciju nakupljanja u organizmu, zbog čega se nazivaju bioakumulativnima. Drugi najčešći anionski tenzidi su sekundarni alkansulfonati (SAS), α -olefinsulfonati (AOS), α -sulfo esteri masnih kiselina (MES), alkil sulfati (AS) te alkil eter sulfati (AES). Najčešći komercijalni tenzidi su natrijev stearat (Slika 3) i natrijev dodecil sulfat (SDS) (Slika 4) koji se mogu pronaći u brojnim kozmetičkim proizvodima, šamponima i sapunima. [5]



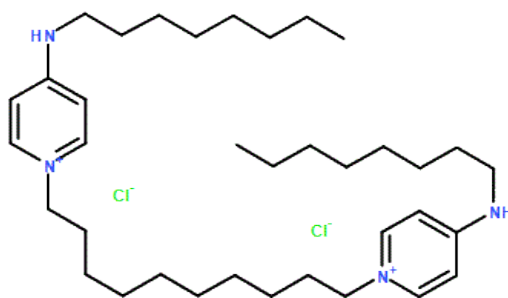
Slika 3. Kemijska struktura natrijevog stearata.



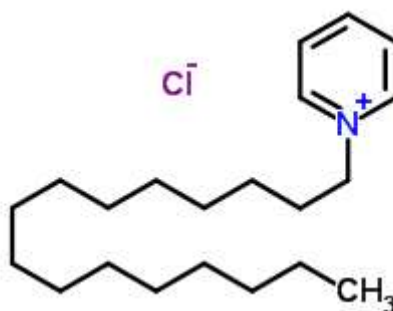
Slika 4. Kemijska struktura natrijev dodecil sulfata (SDS).

2.1.1.2. Kationski tenzidi

Kationski tenzidi su sve tvari koje nose pozitivan naboj koji može biti stalan ili postojati samo u određenim rasponima pH vrijednosti. U vodenim otopinama disociraju na površinski aktivne katione te se adsorbiraju na negativno nabijene površine kao što su tkanine, kosa i stanične membrane bakterija. Kationski tenzidi upotrebljavaju se samo u svrhu postizanja određenih specijalnih učinaka koji uključuju primjenu u ciklusu ispiranja kao omekšivači tkanina te kao dezinficijensi. Važna grupa ovakvih tenzida su kationski tenzidi na bazi amina. To mogu biti primarni, sekundarni i tercijarni amini koji su pozitivno nabijeni, ovisno o pH vrijednost u kojoj se nalaze. Kao primjer kationskog tenzida na bazi amina za dezinfekciju često se koriste trietilamin hidroklorid ili oktenidin dihidroklorid (octenisept) (Slika 5). U ovu skupinu također spadaju i kvarterne amonijeve soli zbog svojeg trajno pozitivnog naboja. Često korišteni alifatski kvarternarni amonijevi spojevi su cetrimonijev bromid, cetilpiridinijev klorid (Slika 6), dimetildioktadecilamonijev klorid. Aromatske kvaterne amonijeve soli uključuju derivate piridina, imidazola te alkilbenzena. [5]



Slika 5. Kemijska struktura oktenidin dihidroklorida.



Slika 6. Kemijska struktura cetilpiridinijeva klorida (CPC).

2.1.1.3. *Neionski tenzidi*

Neionski tenzidi su površinski aktivne tvari kojim hidrofilna skupina nije električki nabijena stoga ne disociraju u vodi. Funkcionalnu skupina se može deprotonirati, ali samo u vrlo niskom pKA stupnju. Topljivi su u polarnim otapalima kao što je voda i ne mijenjaju pH otopine. Alkoholi su slabe kiseline s relativno dobrom topljivošću u vodenim otopinama stoga su primarni alkoholi vezani na nepolarne alifatske repove, cikličke ili aromatske strukture dobri kandidati za neionske tenzide. [5]

2.1.1.4. *Amfolitski tenzidi*

Amfolitski tenzidi su površinski aktivne tvari koje nose i pozitivan i negativan naboj. Naboji mogu biti trajni ili ovisni o pH vrijednosti. Često je kationski dio ili amin ili kvaterni amonijev kation, dok je anionski dio uglavnom karboksilni, sumporni ili fosforna kiselina (ili njeni esteri). [5] Koriste se u kombinaciji s neionskim i anionskim tenzidima u različitim formulacijama proizvoda.

2.1.2. *Primjena tenzida*

Tenzidi imaju ulogu u svakodnevnom životu te ih možemo pronaći u šamponima, sredstvima za čišćenje, kao sredstva za uklanjanje masnoća i za pranje rublja. Također se koriste kako bi se stvorile emulzije, tj. kako bi se povećala topljivost dviju tvari koje se inače ne miješaju. Mogu se koristiti kao sredstva za stvaranje suspenzija. Mnoge sinteze nanočestica provode se uz dodatak površinski aktivne tvari kako bi čestice ostale stabilne u otopini. Jedna od glavnih primjena tenzida je promjena površinske napetosti tekućina. Npr. ako se tekućina treba transportirati iz rezervoara na danu podlogu metodom utiskivanja ili prijenosom igle, ulje niske površinske napetosti (npr. silikonsko ulje) može se pomiješati s ionskim tenzidom koji ima polisiloksanski rep. Nakon migriranja na površinu, nabijena glava tenzida dovest će do jače interakcije u površinskom sloju što stvara neravnotežu sila. Time će se povećati površinska napetost što omogućuje transport većih količina tekućine. Također bitna uloga deterdženata u biokemiji je denaturacija proteina, gdje deterdžent mora biti vrlo blagi da ne uništi i preostale dijelove stanice koji se ispituju. [1-5]

2.2. Kvarterni amonijevi spojevi QACs

Kvarterne amonijeve soli su spojevi koji se uvelike primjenjuju kao dezinficijensi zbog svojih antimikrobnih i antivirusnih svojstava te se stoga koriste u mnogim komercijalnim proizvodima. No kako mikrobi postaju rezistentni na komercijalne QAC-ove, potrebno je sintetizirati nove spojeve sa širokim spektrom aktivnosti. [6] QAC spojevi prvi puta su predstavljani kao derivati heksametilentetramina, te su testirana njihova antimikrobna svojstva. Ubrzo nakon toga razvojem počela je široka uporaba alkil-dimetil-benzil amonijeva klorida ili benzalkonijeva klorida (BAC) u kojem alkilna skupina može biti lanac koji sadrži osam do osamnaest atoma ugljika. Od sredine 1930-ih, mnogi QAC-ovi kao što su benzalkonijev klorid (BAC) i cetilpiridinijev klorid (CPC) intenzivno se koriste kao antibakterijski agensi širokog spektra. [7]

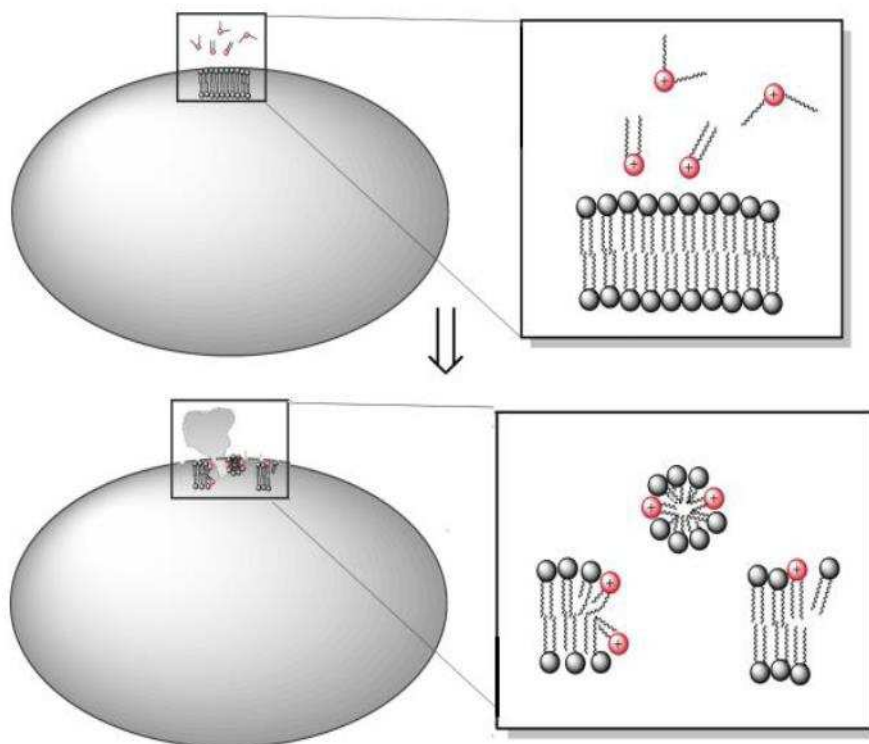
Ova skupina spojeva sastoji se od pozitivno nabijene dušikove „glave“ koja nosi četiri veze ali ni jedna od tih veza nije vodikov atom (Slika 7). Spadaju u skupinu amina i srodni su anorganskim amonijevim solima. Nastaju u reakciji između tercijarnih amina (koji može biti ciklički i aromatski spoj) i alkil-halida pri čemu nastaje kvarterna amonijeva sol i odgovarajući halid. QAC-ovima se također mogu smatrati heterociklički spojevi kod kojih je dušik vezan jednom dvostrukom i dvjema jednostrukim vezama. Imaju trajno pozitivan naboj neovisno o pH u kojem se nalaze stoga se često nazivaju i kvarternim amonijevim kationima. Jednostavni QAC-ovi su topljivi u vodi i vrlo su stabilni. Dolaze u obliku soli najčešće klorida ili bromida, manje u obliku jodida zbog tendencije smanjenja topljivosti. Zbog svoje amfifilne strukture, što znači da imaju polarnu „glavu“ i nepolarni „rep“, sposobni su formirati micelle. Testiraju se na kritične micelarne koncentracije (CMC) i zbog toga imaju široku primjenu. [6,7]



Slika 7. Opća struktura QAC.

2.2.1. QAC spojevi kao antimikrobni agensi

Zbog amfilne strukture QAC spojeva, njihov mehanizam djelovanja je sličan deterdžentima. Pozitivno nabijene „glave” QAC-ova elektrostatskim interakcijama reagiraju s negativno nabijenim fosfolipidima stanične stjenke bakterija. S druge strane, njihov alkilni „rep“ hidrofobnim interakcijama prodire u unutarstanični prostor bakterije. Nakon prodiranja dolazi do curenja citoplazmatskog sadržaja i to dovodi do smrti stanice (Slika 8). Meta ovih spojeva je stanična membrana bakterija pa se mogu smatrati antibioticima širokog spektra. Bolju aktivnost pokazuju prema Gram – pozitivnim bakterijama, iako se one sastoje od 95% mureina i jednostruke membrane. Kod Gram – negativnih bakterija stanična stjenka je tanja, postotak mureina je manji, ali zbog dvostruke membrane probijanje do citoplazmatskog sadržaja je teže. Biološka aktivnost benzalkonijevih soli ovisi o duljini alkilnog lanca. Poznato je da C₁₂-C₁₄ spojevi pokazuju jače baktericidno djelovanje. QAC spojevi pokazuju i biološku aktivnost protiv gljivica i kvasaca ali mehanizam djelovanja nije jednak kao protiv bakterija. Ključ antifungalnog djelovanja, dokazanog na primjeru CTAB-a, je taj da usred vezanja na membranu stanice dolazi do promjene površinskog naboja iz negativnog u pozitivni što postepeno dovodi do njezine smrti. [8]



Slika 8. Mehanizam djelovanja QAC-ova na membranu mikroorganizma. [8]

2.2.3. QAC spojevi benzimidazola

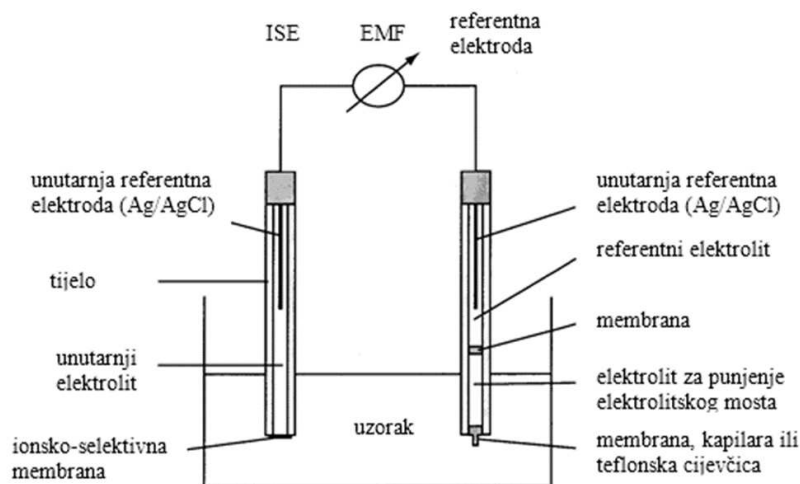
Imidazol je aromatski, peteročlani heterociklički spoj s dva dušikova atoma na položaju 1,3 molekulske formule $C_3H_4N_2$. U njegovoj strukturi jedan dušikov atom je nalik dušiku u pirolu (N-1), a drugi je iminskog tipa kao u piridinu (N-3).

Benzimidazol je heterociklička molekula koju možemo promatrati kao spoj imidazola i benzena. Benzen je spojen s *d* stranicom imidazola. Reakcijom kvaternizacije tj. N-alkilacije benzimidazola pri bazičnim uvjetima u zatvorenom sustavu nastaju kvaterne amonijeve soli.

Benzimidazol reagira s odgovarajućim alkil-halogenidom prema S_N2 mehanizmu gdje nastaje N-alkilbenzimidazol. Potom dobiveni spoj ulazi u reakciju s drugom molekulom alkil-halogenida gdje nastaje kvarterna amonijeva sol. [10]

2.3. Potenciometrija

Potenciometrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na mjerenju razlike potencijala sustava elektroda. Potenciometrijski sustav sastoji se od dvije elektrode, referentne i indikatorske. Kada se takve dvije elektrode povežu elektrolitski, kako bi se mjerila promjena koncentracije analita, na razliku potencijala, dobiva se elektrokemijska ćelija (Slika 11). Mjerena razlika potencijala između elektroda naziva se elektrodni potencijal. Standardni elektrodni potencijal određen je mjerenjem relativnih elektrodnih potencijala uz standardne uvjete u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu te iznosi 0 V pri svim temperaturama. Kalomelova elektroda (Hg/Hg_2Cl_2) i srebro/srebrov klorid ($Ag/AgCl$) elektroda najkorištenije su referentne elektrode. Kada kroz ćeliju teče jako mala struja koja ne utječe na stanje ravnoteže elektroda, tada je mjereni potencijal proporcionalan logaritmu aktiviteta analita. Kod kemijskih reverzibilnih reakcija na elektrodama potenciometrijom se mogu odrediti parametri poput promjene slobodne entalpije, konstanta ravnoteže, aktivitet i koeficijent aktiviteta ispitivanih analita u otopinama. [11-13]



Slika 11. Shema potencijometrijskog sustava za mjerenje.

Potencijometrijska mjerenja dijele se na metodu potencijometrijske titracije i direktnu potencijometriju. Potencijometrijska titracija je metoda pri kojoj se u elektrokemijsku ćeliju dodaje titrans ili standardna otopina, te se na taj način mijenja aktivitet određivane molekulske vrste, a time i potencijal indikatorske elektrode. Očitava se promjena potencijala indikatorske elektrode u odnosu prema volumenu dodanoga titransa te se kod najvećeg skoka potencijala može odrediti točka ekvivalencije, odnosno završna točka titracije. Instrument za automatsko izvođenje potencijometrijske titracije naziva se automatski titrator (potenciograf, titrigraf). Princip rada automatskog titratora temelji se na mjerenju volumena titransa i zapisivanju promjene potencijala indikatorske elektrode u ovisnosti o volumenu titransa. [1,11,12]

Direktna potencijometrija je brza, jednostavna i pogodna metoda određivanja aktiviteta mnogih kemijskih vrsta koja se također temelji na mjerenju razlike potencijala između indikatorske i referentne elektrode uronjene u ispitivanu otopinu. Napon ćelije ovisi samo o aktivitetu ionske vrste na koju je indikatorska elektroda osjetljiva.

Elektrodni potencijal elektrokemijske ćelije izražava se pomoću Nernstove jednadžbe (1) te vrijedi kada elektroda ima odziv samo na ione analita to jest kod idealnih uvjeta.

$$E = E^0 + \frac{2.303 * RT}{Z_A F} \cdot \log a \quad (1)$$

E – ukupni izmjereni potencijal

E^0 – standardni elektrodni potencijal

R – opća plinska konstanta (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹)

T – termodinamička temperatura

Z_A – naboj iona

F – Faradayeva konstanta (96 487 C mol⁻¹)

a – aktivitet analita

2.3.1. Indikatorske elektrode

Indikatorske elektrode koje se upotrebljavaju kod potenciometrijskih titracija mogu biti raznolike. Dije se prema načinu nastajanja razlike potencijala na dodirnoj površini elektrode i otopina. Prilikom elektrokemijske reakcije na dodirnoj površini elektrode dolazi do razdvajanja naboja, a time i do razlike potencijala između elektrode i otopine. Indikatorske elektrode dijele se na kovinske i selektivne (membranske). Kod kovinskih elektroda razlika potencijala na dodirnoj granici elektrode i otopine posljedica je redoks reakcija. Razlika potencijala kod membranskih elektroda proizlazi iz promjene slobodne entalpije reakcije prijelaza iona adsorpcijom, ekstrakcijom ili ionskom izmjenom molekula ispitivane otopine. [14]

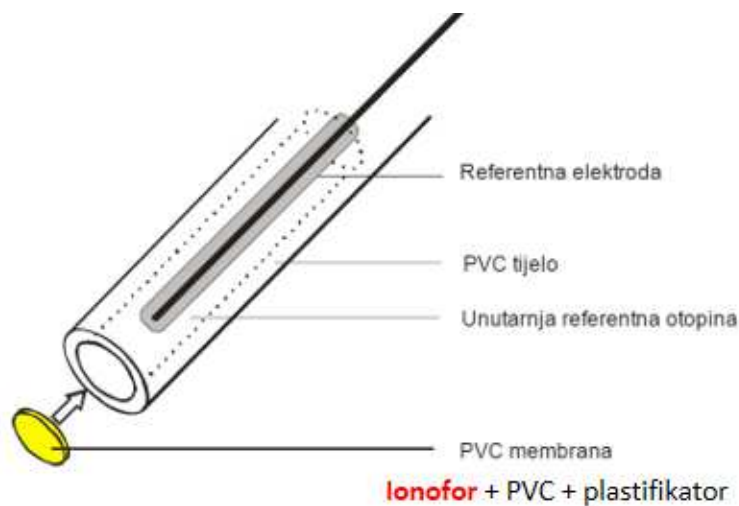
2.3.1.1. Ion - selektivne elektrode

Senzori su uređaji kojima se detektira i kvantificira vrijednost mjerljivog svojstva tvari (npr. masa, koncentracija, intenzitet svjetlosti). Potenciometrijski ionski senzori ili ion-selektivne elektrode (ISE) su senzori koji mjere razliku potencijala između dvije elektrode u uvjetima bez protoka struje te imaju sposobnost selektivnog odziva na neku vrstu iona u otopini uzorka. Za djelotvornost je odgovorna njihova ionsko-selektivna membrana koja se sastoji od ionofora, lipofilnog iona, polimernog matriksa i membranskog otapala ili plastifikatora.

Karakteristična ionsko-selektivna membrana se sastoji od oko 33 % poli(vinil) klorida – PVC, oko 66 % plastifikatora te 1 % ionofora, ostatak udjela pripada lipofilnom djelu (slika 12). Za selektivnost je najzaslužniji ionofor – ionski par, zbog stvaranja vrlo jakog kompleksa s ciljanim ionom i otežanog kompleksiranja s drugim ionima. Lipofilni dodatak također poboljšava selektivnost i doprinosi održavanju ukupne količine određivanog iona unutar membrane konstantnom.

Lipofilni dodatak membrana selektivnih na katione najčešće sadrže derivate tetrafenilborata. Membrane selektivne na anione sadrže tetraalkilamonijeve soli. Uloga plastifikatora u membrani je smanjenje viskoznosti i osiguravanje dobre mobilnosti sastojaka membrane. Također djeluje i kao membransko otapalo i ima utjecaj na selektivnost membrane, ali i na kompleksiranje iona s ionoforom. Plastifikator mora biti kompatibilan s polimerom, dok preostali dijelovi membrane moraju biti topljivi u njemu.

Prednosti ovakvih tenzidnih senzora su veća osjetljivost i pouzdanost, niska granica detekcije, ne uništavaju uzorak, nisu skupi i mogu se prenositi zbog čega su pogodni za primjenu i praćenje u okolišu. S druge strane nedostatak ovih senzora može biti selektivnost, odnosno reagiranje s interferencijama koje se nalaze u mjernom sustavu. [1,14,15]



Slika 12. Shema indikatorne ISE.

2.3.1.2. Princip rada senzora

Svojstva ISE su selektivnost i dinamičko područje, područje linearnosti, radno područje, granica kvantifikacije i granica detekcije, vrijeme odziva, točnost, preciznost i istinitost. ISE daju odziv na aktivitet iona analita, a logaritam aktiviteta analita proporcionalan je izmjenom na membrani, u odnosu na referentnu elektrodu.

Kod tenzidnih senzora odziv elektrode baziran je na Nernstovoj jednadžbi (1,2) gdje se Nernstov nagib označava simbolom S (3), E je ukupni izmjereni potencijal, E^0 standardni elektrodni potencijal i a_{AS-} označava aktivitet anionskog surfaktanta.

$$E = E^0 - S \log a_{AS-} \quad (2)$$

$$S = \frac{RT}{Z_A F} \quad (3)$$

R – opća plinska konstanta ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T – termodinamička temperatura

Z_A – naboj iona

F – Faradayeva konstanta ($96\,487 \text{ C mol}^{-1}$)

Selektivnost je sposobnost određivanja jedne molekulske vrste bez utjecaja na druge vrste koje su prisutne u mješavini uzoraka. Osjetljivost elektrode na različite vrste iona određuje se koeficijentom selektivnosti. Mjera odgovora ion-selektivne elektrode na druge ione naziva se koeficijent selektivnosti. Kako se koeficijent selektivnosti povećava osjetljivost elektrode se smanjuje.

Područje u kojem senzor daje odziv naziva se dinamičko područje, a područje linearnosti je ono u kojem senzor daje odziv proporcionalan koncentraciji analita u uzorku. Karakterističan nagib linearnog dijela krivulje pri 298 K je 59,16 mV za jednovalentne ione, a 29,58 mV za dvovalentne ione. Granica detekcije je najniža koncentracija pri kojoj elektroda može izmjeriti razliku potencijala. Obično granice detekcije za ISE elektrode iznose od reda veličine 10^{-8} do 10^{-6} ovisno o vrsti interferencija koje se nalaze u mjernom sustavu.

Vrijeme odgovora definira se kao vrijeme koje je potrebno da se ion u otopini uravnoteži s osjetljivim djelom membrane. Interferirajući ioni mogu odgoditi stvaranje iona koji se moraju transportirati da bi došlo do razlike potencijala.

Granica kvantifikacije je najmanja koncentracija analita koja se može kvantitativno odrediti. Točnost se definira kao stupanj podudaranja između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Kako bi mjerenje bilo točno izmjereni podaci ne smiju odstupati više od $\pm 5\%$. Preciznost je slaganje između niza provedenih mjerenja iz istog uzorka prema propisanom analitičkom postupku te se ono iskazuje standardnim odstupanjem, varijancom i relativnim standardnim odstupanjem. Istinitost je stupanj podudaranja između srednje vrijednosti i prihvaćene referentne vrijednosti. Iskazuje se kao sustavna pogreška mjernog uređaja, a računa se kao razlika aritmetičke sredine i referentne vrijednosti. [12-15]

2.3.1.3. Ionofor

Ionofor je ionski asocijat nastao od velikog kationa (obično kationski tenzid) i velikog anionskog tenzida (veliki organski ili anorganski anion) ugrađen u senzorsku membranu elektrode. Slika 13 prikazuje ciklički primjer ionofora.

Formacija se temelji na sljedećim reakcijama taloženja:



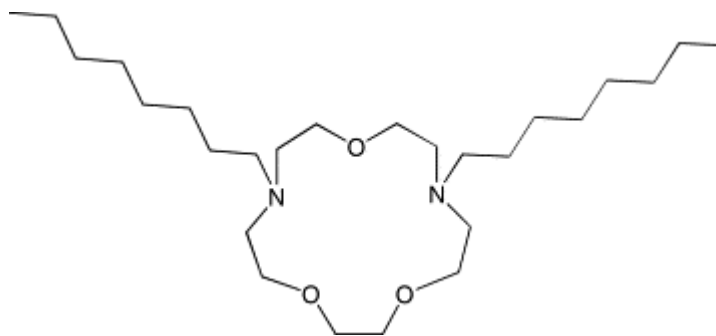
$$K_{pt} = a_{KS^+} \cdot a_{AS^-} \quad (6)$$

$$E = E^0 - S \log \frac{K_{pt}}{a_{KS^+}} \quad (7)$$

$$E = Konst + S \log a_{KS^+} \quad (8)$$

$$Konst = E^0 - \log K_{pt} \quad (9)$$

KS^+ - kationski tenzid i AS^- - anionski tenzid, tvore KSAS - ionski par koji je osnovna komponenta senzorske membrane. K_{pt} - konstanta produkta topljivosti definira topljivost ionskog para, jednačba (6) gdje je a_{AS^-} - aktivitet anionskog tenzida i a_{KS^+} aktivitet kationskog tenzida. Poželjno svojstvo ionskog para je jako slaba topivost, čime se smanjuje disocijacija iona iz taloga. Iz jednačbe 6 izvodi se izraz $a_{AS^-} = \frac{K_{pt}}{a_{KS^+}}$ te umetanjem u izraz (2) dobiva se izraz (7). Iz izraza (8) i (9) vidljivo je da je za promjenu potencijala zaslužna konstanta topljivosti ionskog para. Niža konstanta topljivosti rezultira većom promjenom potencijala kod točke ekvivalencije što daje senzoru veću osjetljivost. [1, 15]



Slika 13. Kemijska struktura cikličkog ionofora 7,13-bis(n-oktil)-1,4,10-trioksa-7,13 diazaciklopentadekana.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Kemikalije

Za ispitivanje elektrode korišteni su sljedeći reagensi:

natrijev dodecilsulfat (SDS, $c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

natrijev dodecilbenzensulfonat (DBS, $c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L)

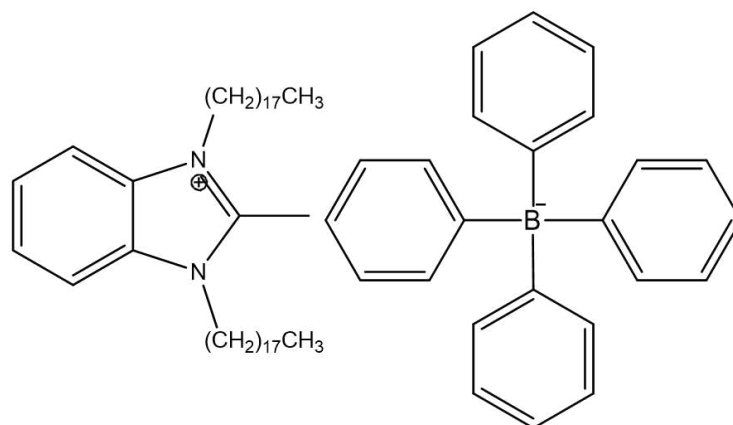
heksadecil piridinijev klorid monohidrat (CPC, $c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB, $c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

benzetonijev klorid (HYAMINE 1622, $c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

1, 3-didecil-2-metilimidazolijev klorid (DMIC, $c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L)

U ovom radu kao ionski par za membranu senzora korišten je 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ijev tetrafenilborat (MDBI-TPB) dobiven sintezom kvarterne amonijeve soli imidazola sa tetrafenil boratom. Ova kvarterna amonijeve sol djeluje kao kationski tenzid jer u strukturi ima dugačak alkilni lanac od osamnaest ugljikovih atoma te pozitivno nabijen dušikov atom (Slika 14).

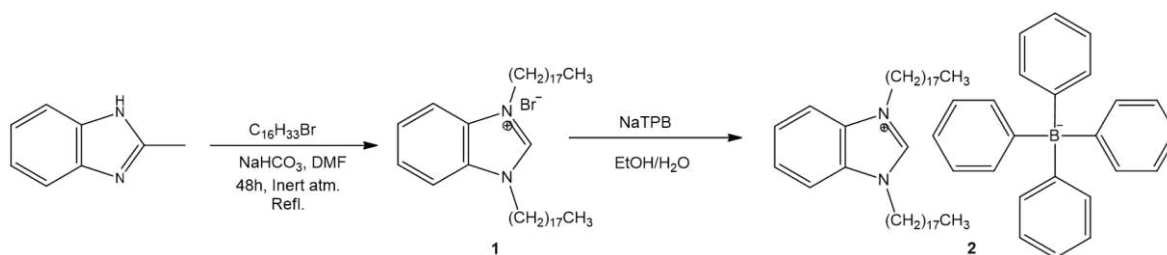


Slika 14. Kemijska struktura ionofora 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ijeva tetrafenilborata (MDBI-TPB).

3.2. Sinteza QAC-TPB

Dobivanje kvarterne amonijeve soli temelji se na dva koraka (slika 15):

- 1) S₂N reakcija alkiliranja 2-metilbenzimidazola s alkilhalogenidom (1-bromooktadekan) (2-metilimidazol (2 mmol) miješati s NaHCO₃ (3,5 mmol) u DMF-u u inertnoj atmosferi 1h. Dodati 1-bromooktadekan (5 mmol) i reakciju pratiti TLC-om. Otkloniti otapalo rotacijskim uparivačem, i 3 puta filtrirati sa 5-10 mL metanola, zatim postupak ponoviti 3 puta sa 5-10 mL heksana.
- 2) Reakcija metateze s natrijevim tetrafenilboratom (0,8 g 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ijevog borata miješati sa 1,3 g natrijevog tetrafenilborat u acetonitrilu. Otkloniti otapalo rotacijskim uparivačem, preostali bijeli talog isprati sa DCM.)



Slika 15. Shema sinteze 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ijeva tetrafenilborata (MDBI-TPB).

3.3. Izrada tenzidnog senzora i aparatura

3.1.1. Izrada tenzidnog senzora

Smjesa ionskog para 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ijevog borata se otopi u 2 mL tetrahidrofurana pomoću ultrazvučne kupelji za homogenizaciju. Zatim se bistra otopina ulijeva u stakleni prsten (Slika 16). Nakon stvrdnjavanja se izbruse mali diskovi i montiraju u tijelo elektrode Philips IS-561 (Glasblaeserei Moeller, Zürich, Švicarska). Kao unutarnji elektrolit korištena je smjesa od 5 mL natrijeva dodecilsulfata ($c = 10^{-3}$ mol/L) i 0,2 ml otopine natrijeva klorida ($c = 10^{-2}$ mol/L) (slika 17). Između mjerenja senzor je držan u destiliranoj vodi (Slika 18).



Slika 16. Priprema tijela elektrode.



Slika 17. Membrana elektrode.



Slika 18. Mjerni sustav: Senzor za tenzide (lijevo) i referentna elektroda (desno) uronjeni u vodenu otopinu analita.

3.1.2. Aparatura

Za ispitivanje odziva elektrode korišten je automatski sustav za doziranje otopina s preciznošću 0,001 mL (765 Dosimat, Metrohm, Švicarska), jedinica za doziranje (806 Exchange unit, Metrohm, Švicarska), pH-metar (780 pH-meter, Metrohm, Švicarska), te magnetska miješalica (Slika 19). Kod potenciometrijskih titracija korišten je titrator 808 Titrando (Metrohm, Švicarska) kombiniran s izmjenjivačkom jedinicom Metrohm 806 (Metrohm, Švicarska) i kontroliran programom Tiamo (Metrohm, Švicarska) (Slika 20). Tijekom titracije i mjerenja otopine su miješane magnetskom miješalicom 727 Ti Stand (Metrohm, Švicarska). Za obradu podataka korišten je program Excel u sustavu Microsoft Office.



Slika 19. Sustav za potenciometrijska mjerenja odziva senzora (765 Dosimat).



Slika 20. Sustav za potenciometrijske titracije (Titrator 808 Titrand).

3.4. Potenciometrijska karakterizacija tenzidnog senzora

Za karakterizaciju tenzidnog senzora prvi korak je mjerenje linearnog područja odziva. Pripremljene su standardne otopine SDS, DBS, CPC, CTAB i HYAMINE koncentracija ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L). U 25 ml demineralizirane vode dodaje se odabrana otopina tenzida u definiranim inkrementima ukupnog volumena 20 mL, a vrijeme između inkremenata bilo je 120 s. Za miješanje se koristila magnetska miješalica. Svako mjerenje ponavljano je neovisno 5 puta. Mjerenje se izvodilo pri sobnoj temperaturi bez podešavanja ionske jakosti i pH vrijednosti.

Nakon mjerenja odziva, izmjerene su potenciometrijske titracije odabranih otopina tenzida SDS, DBS, CPC, CTAB i HYAMINE koncentracije ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L).

Otopina analita pripremljena je tako da je otpipetirano 5 mL odgovarajućeg tenzida i 25 mL demineralizirane vode u čašu za mjerenje. Za svaki analit provedeno je 5 neovisnih serija mjerenja. Mjerenja su provedena automatskim dodavanjem inkrementalnih volumena odgovarajućih tenzidnih otopina titranta u otopine analita putem Metrohm dozirajuće klipne birete. Uzeti su realni uzorci vode iz potoka u Domašincu i pripremljeni su za testiranje senzora. U uzorke vode iz potoka dodane su poznate količine odgovarajućeg tenzida koji služi kao analit te je provedeno mjerenje potenciometrijskom titracijom odgovarajućeg tenzidnog titranta na tri različita nivoa koncentracije. U 25 mL vode iz potoka dodana je poznata količina anionskog tenzida SDS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L) i kao titrans korištene su otopine kationskog tenzida CPC ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L). Ovom metodom standardnog dodatka provjereno je da li u uzorku vode ima anionskih tenzida.

Pomoću tenzidnog senzora također su izmjerene koncentracije kationskih i anionskih tenzida u komercijalnim proizvodima. Uzeti su proizvodi Ajax[®] (Spring flowers i Lilac breeze) sredstvo za čišćenje podova, Arf[®] (cream) univerzalno sredstvo i Clin[®] (Lemon) sredstvo za čišćenje staklenih površina koji deklarirano sadrže anionske tenzide. Ispitivano je i sredstvo za čišćenje kupaoonica Cilit Bang[®] koji deklarirano sadrži udio kationskog tenzida. U 25 mL demineralizirane vode dodano je po 1 mL komercijalnog sredstva i titrirano odgovarajućom otopinom kationskog ili anionskog tenzida.

3.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.5.1. Metoda

Ispitivanje osjetljivosti mikroorganizama na novi kvarterni amonijev spoj određivano je Difuzijskim postupkom. Difuzijski postupak izvodi se čistom bakterijskom kulturom na čvrstoj hranjivoj podlozi. Takva podloga mora omogućiti nesmetano razmnožavanje i rast bakterija, a pritom ne smije ometati difundiranje tenzida ili smanjivati njegovu djelotvornost. Na krutoj hranjivoj podlozi postavlja se disk od filter papira natopljen određenom količinom antibiotika i mjerenjem zone inhibicije rasta bakterija određuje se njezina osjetljivost. [16] U našem eksperimentu, umjesto antibiotika korištena je odgovarajuća količina kationskog tenzida.

3.5.2. Mikroorganizmi

Korišteni su sojevi:

Pseudomonas aeruginosa 3955 CCM, 27853 ATCC,

Staphylococcus aureus 3953 CCM, 25923 ATCC

Aspergillus niger 8222 CCM, 16404 ATCC

Escherichia coli 3954 CCM, 25922 ATCC

Candida albicans 8215 CCM, 10231 ATCC

3.5.3. Eksperimentalni dio

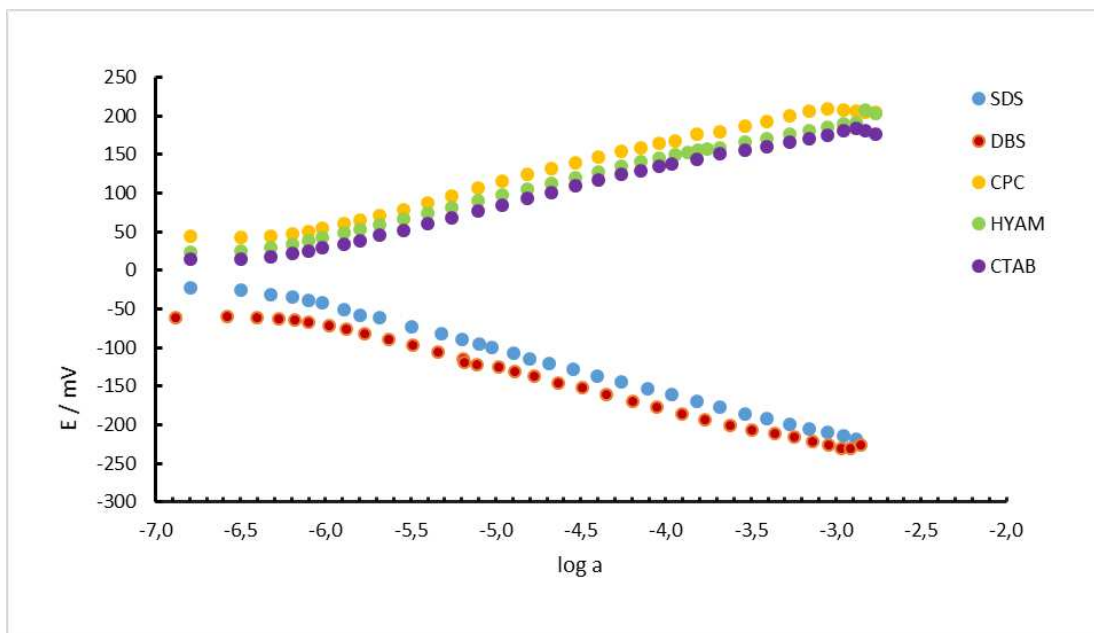
U 5 mL fiziološke otopine NaCl, u sterilnoj kivetici otopljeno je 10 kolonija mikroorganizama uzetih sa hranjive podloge. Koncentracija takve suspenzije izmjerena je na spektrofotometru (Hach DR 6000). Na odgovarajuću podlogu je stavljen papirnati disk impregniran definiranom koncentracijom tenzida koja je prethodno premazana kalibriranim inokulumom čiste i svježe kulture bakterijskog soja koji se ispituje. Nakon inkubacije sojeva izmjerene su zone inhibicije koje su vidljive na slikama. Kao hranjiva podloga za bakterije je korišten Mueller – Hinton agar. Sloj takvog agara u Petrijevoj zdjelici za 25 mL podloge mora biti 4 mm. Za kvasce i plijesni korištena je hranjiva podloga Sabouraud agar. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* su inkubirane na 37°C i 24 h, a *Aspergillus niger* te *Candida albicans* na 27°C i 3 dana. Točne koncentracije i izmjereni volumeni nalaze se u tablici 7.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Odziv tenzidnog senzora

Nakon 5 uzastopnih mjerenja odziva svake otopine tenzida dobiveni su rezultati i obrađeni u programu Excel sustava Microsoft Office. Vrijednost nagiba i koeficijent korelacije (R^2) dobiveni su iz linearnog područja kalibracijskog grafa.

Za ispitivanje odziva elektrode (MJ-12-TPB) u vodi korištene su otopine SDS, DBS, CPC, HYAMINE i CTAB koncentracija ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Slika 21 prikazuje odzivne karakteristike elektrode na otopine tenzida pomoću krivulje ovisnosti elektrodnog potencijala (E/mV) o logaritmu aktiviteta (log a) odgovarajućih otopina tenzida. Statistika odzivnih karakteristika navedena je u tablici 1.



Slika 21. Odzivne karakteristike senzora MJ-12-TPB na otopine SDS, DBS, CPC, HYAMINE i CTAB koncentracija ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) u vodi.

Tablica 1. Statistika odzivnih karakteristika MJ-12-TPB senzora u vodi

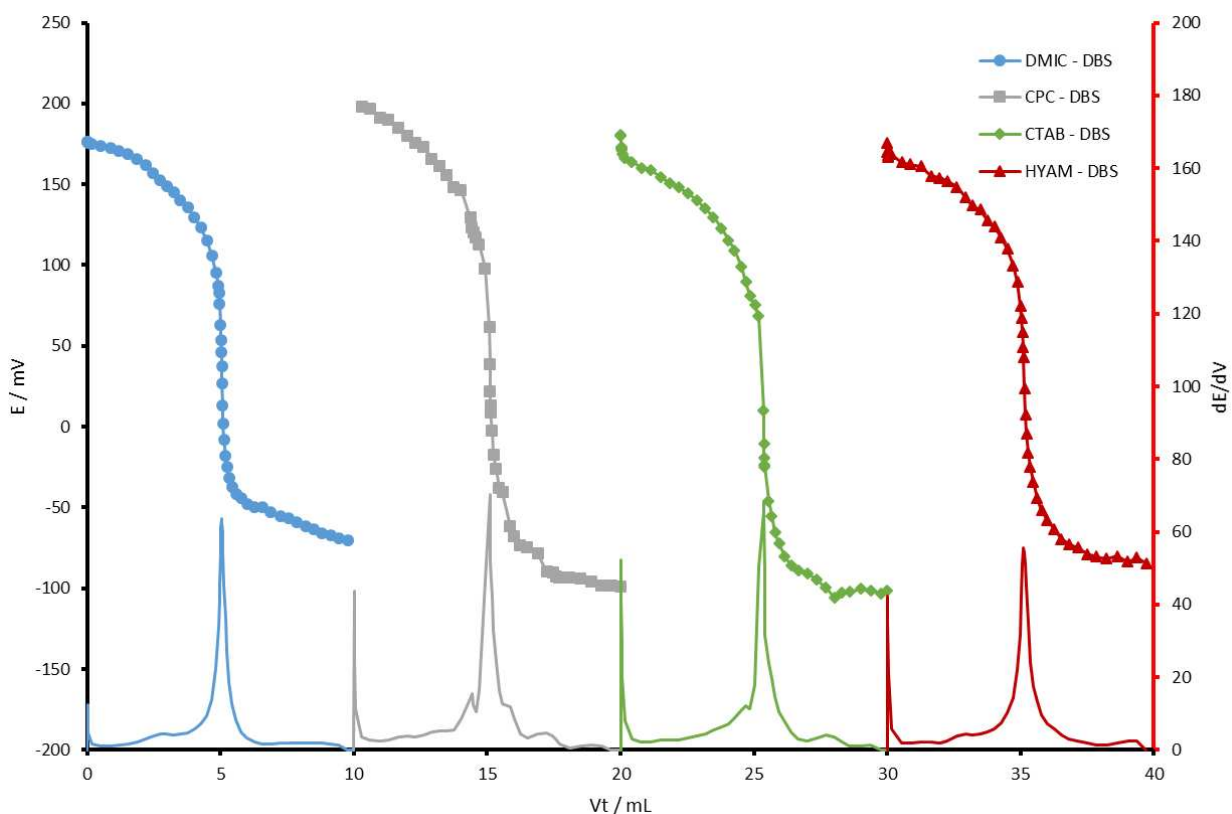
Parametri	Nagib/(mV/dekadi aktiviteta)	Korelacijski koeficijent (R^2)
SDS u H ₂ O	-54,999	0,996
DBS u H ₂ O	-53,191	0,998
CPC u H ₂ O	53,346	0,997
HYAMINE u H ₂ O	48,171	0,995
CTAB u H ₂ O	48,847	0,994

4.2. Titracije modelnih uzoraka

Točnost i preciznost tenzidne elektrode (MJ-12-TPB) određivana je metodom potenciometrijske titracije gdje su u prvom slučaju kao analiti korištene otopine DMIC, CPC, CTAB i HYAMINE ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) a kao titrant DBS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L).

U drugom slučaju kao analit služila je otopina DBS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L), a kao titransi otopine DMIC, CPC, CTAB i HYAMINE ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L).

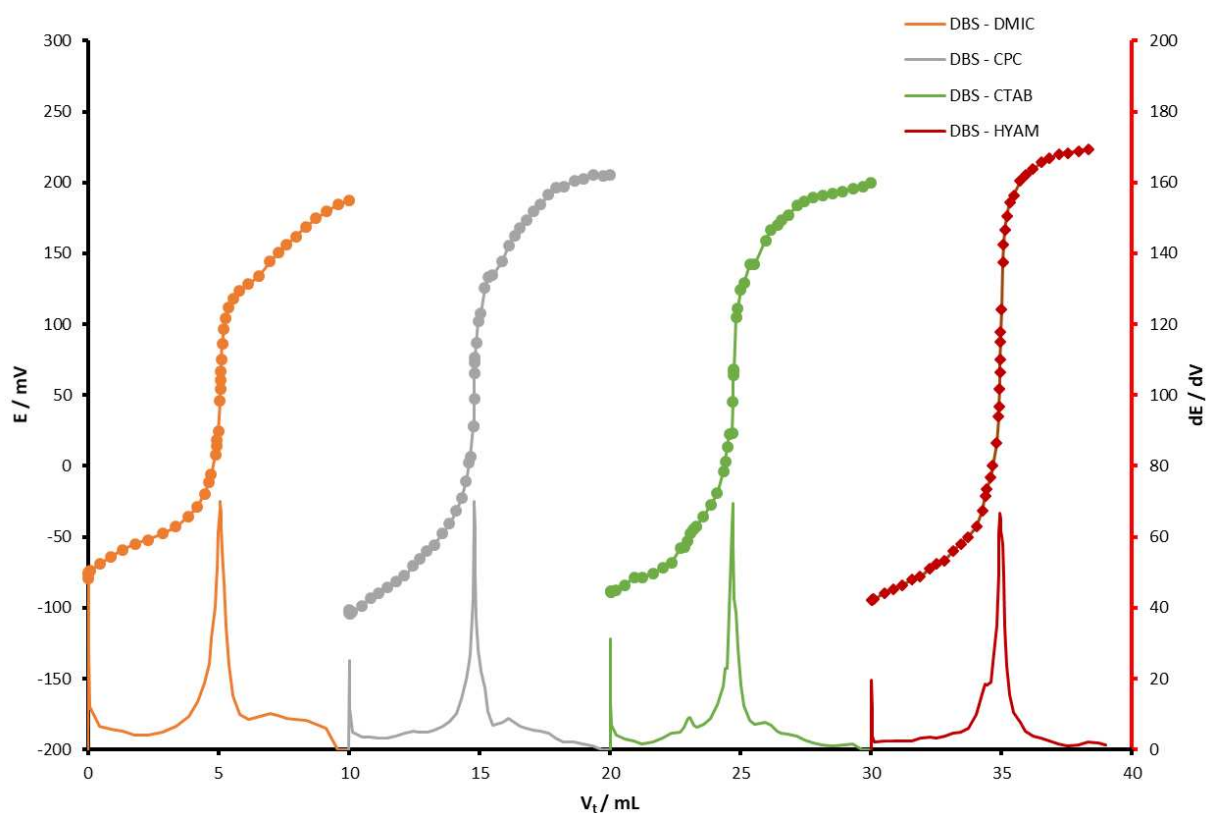
Na Slikama 22 i 23 prikazane su titracijske i derivacijske krivulje pri titracijama odgovarajućeg tenzida koncentracija $4 \cdot 10^{-3}$ mol/L s odgovarajućim analitom (5 mL analita iste koncentracije i 25 mL demineralizirane vode). Rezultati su dobiveni na temelju 5 uzastopnih potenciometrijskih titracija. Statistički podaci navedeni su u tablicama 2 i 3.



Slika 22. Titracijske i derivacijske krivulje dobivene titracijom otopina DMIC, CPC, CTAB i HYAMINE ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) sa titransom DBS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) koristeći senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije.

Tablica 2. Statistika određivanja otopina DMIC, CPC, CTAB i HYAMINE uz DBS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) kao titrans i MJ-12-TPB senzor kao detektor završne točke titracije

Analit	Ukupna promjena potencijala $\Delta E/mV$	Vrijednost prve derivacije u EP/ $mVcm^{-3}$	Točnost u %
DMIC	-245,9	63,5	99,4
CPC	-296,9	70,3	98,2
CTAB	-281,3	68,2	92,4
HYAMINE	-261,8	55,6	97,8



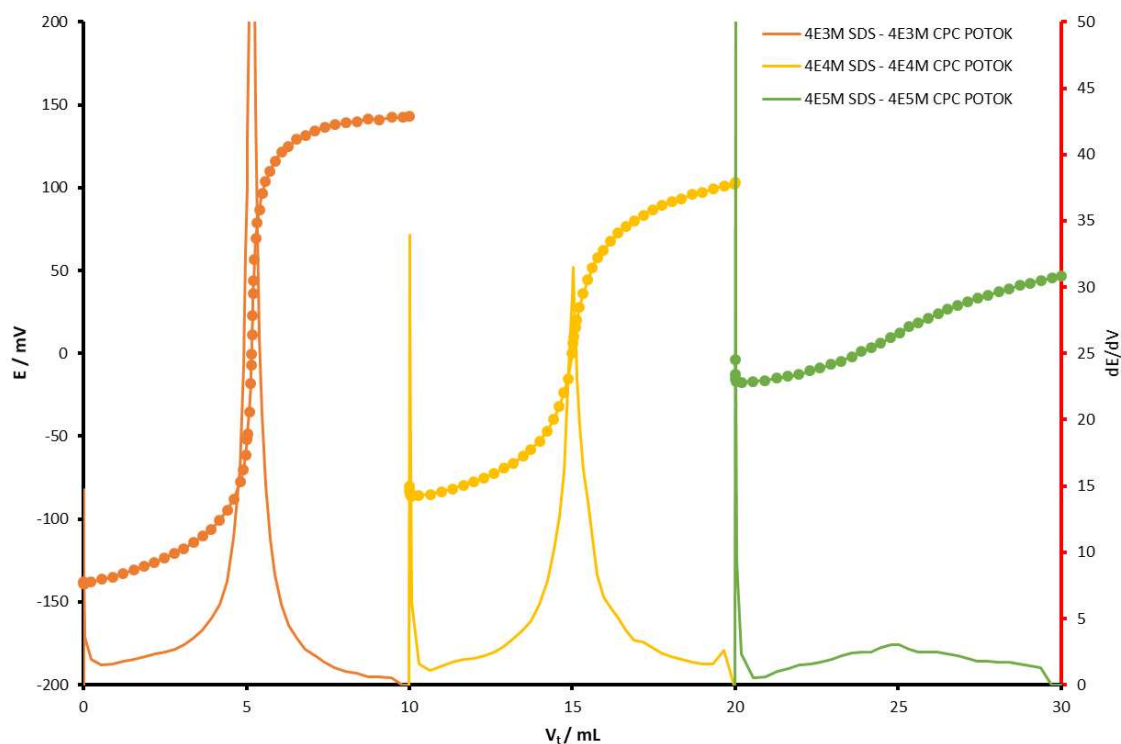
Slika 23. Titracijske i derivacijske krivulje otopine DBS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) sa otopinama DMIC, CPC, CTAB i HYAMINE ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) kao titrans koristeći senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije.

Tablica 3. Statistika određivanja otopine DBS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) uz otopine DMIC, CPC, CTAB i HYAMINE kao titrans koristeći senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije

Analit	Titrant	Ukupna promjena potencijala $\Delta E/mV$	Vrijednost prve derivacije u $EP/mVcm^{-3}$	Točnost u %
DBS	DMIC	+266,6	70,1	98,8
DBS	CPC	+317,3	69,9	95,9
DBS	CTAB	+278,5	69,4	94,1
DBS	HYAM	+330,8	66,8	98,7

4.3. Titracije realnih uzoraka

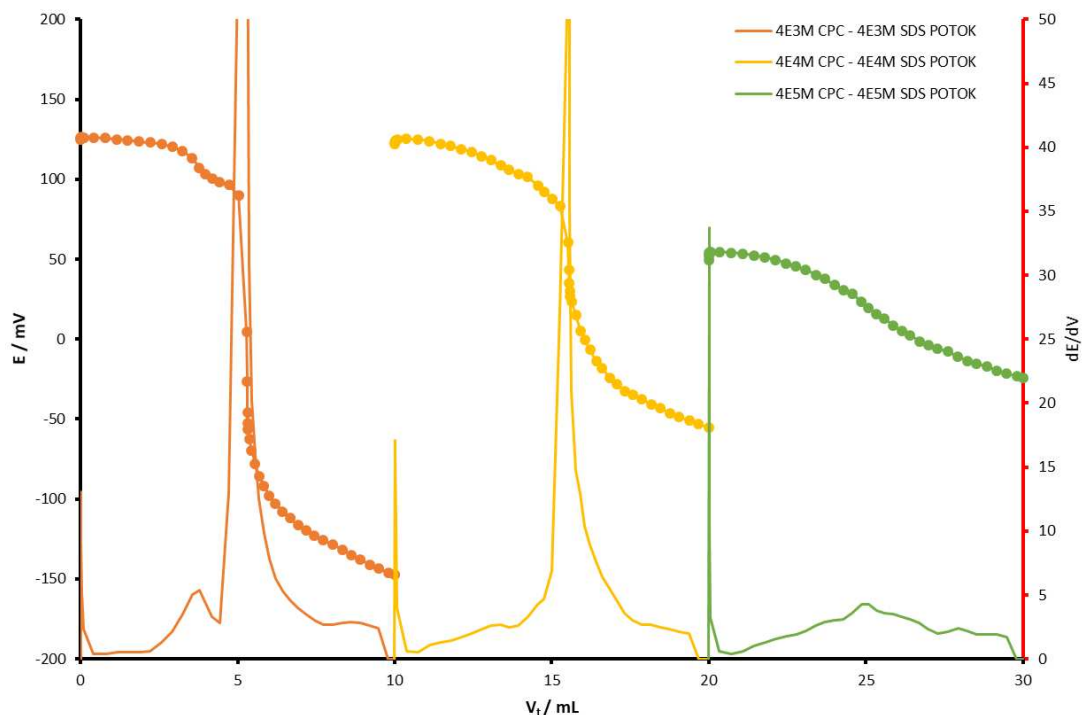
U uzorke vode iz potoka dodane su poznate količine odgovarajućeg tenzida koji služi kao analit te je provedeno mjerenje potenciometrijskom titracijom odgovarajućeg tenzidnog titranta na tri različita nivoa koncentracije. Potenciometrijske i derivacijske krivulje prikazane su na slikama 24 i 25, a podaci su navedeni u tablicama 4 i 5.



Slika 24. Titracijske i derivacijske krivulje određivanja otopine SDS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L) sa CPC kao titrant jednakih koncentracija i senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije.

Tablica 4. Statistika određivanja otopine SDS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L) sa CPC kao titrant jednakih koncentracija i senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije

Titrant	Analit	Dodana količina/M	Pronađena količina/M	Iskorištenje %
CPC	SDS	$4 \cdot 10^{-3}$	$3,86 \cdot 10^{-3}$	103,5%
CPC	SDS	$4 \cdot 10^{-4}$	$3,98 \cdot 10^{-4}$	100,5%
CPC	SDS	$4 \cdot 10^{-5}$	$3,96 \cdot 10^{-5}$	101%



Slika 25. Titracijske i derivacijske krivulje određivanja otopine CPC ($c = 4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L) sa titrantom SDS jednakih koncentracija i senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije.

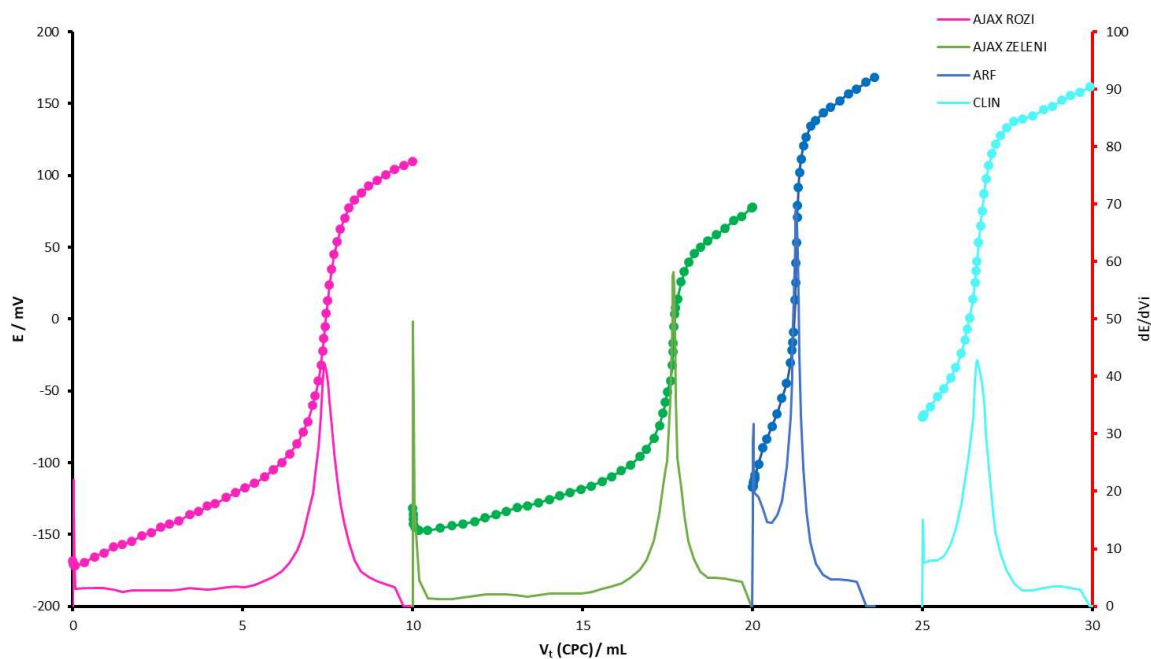
Tablica 5. Statistika određivanja otopine CPC ($c = 4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L) sa titrantom SDS jednakih koncentracija i senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije

Titrant	Analit	Dodana količina/M	Pronađena količina/M	Iskorištenje %
SDS	CPC	$4 \cdot 10^{-3}$	$3,77 \cdot 10^{-3}$	105,6%
SDS	CPC	$4 \cdot 10^{-4}$	$3,66 \cdot 10^{-4}$	108,5%
SDS	CPC	$4 \cdot 10^{-5}$	$3,94 \cdot 10^{-5}$	101,5%

Obradom podataka određivanja dodanih tenzida u uzorke vode iz potoka vidljivo je da na njihovo određivanje postoji minimalan utjecaj vode iz potoka. U prvom slučaju titracije anionskog tenzida SDS sa CPC na tri različite koncentracije iskorištenje iznosi od 100,5% do 103,5%. U drugom slučaju titracije kationskog tenzida CPC sa SDS na tri različite koncentracije iskorištenje se proteže od 101,5% do 108,5%.

4.4. Potenciometrijska titracija komercijalnih proizvoda

Titrirana su četiri komercijalna proizvoda za čišćenje od kojih svaki ima različit udio anionskih tenzida: Ajax® (Spring flowers i Lilac breeze) sredstva za čišćenje podova, Arf® (cream) univerzalno sredstvo i Clin (Lemon) sredstvo za čišćenje staklenih površina. Dobivene titracijske i derivacijske krivulje prikazane su na slici 26 a pronađene koncentracije navedene su u tablici 6.

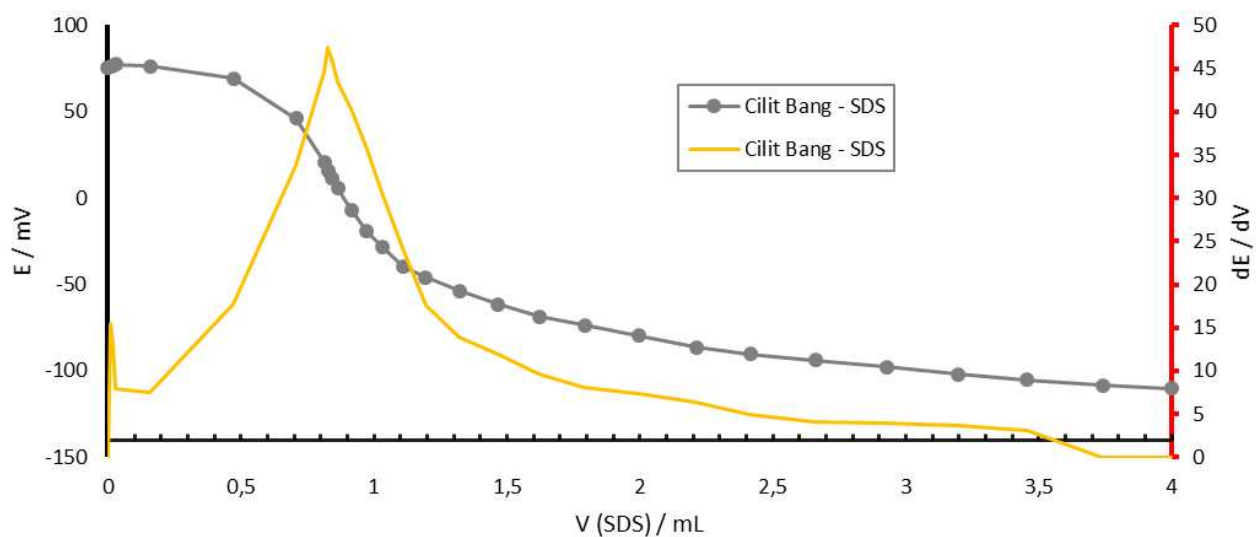


Slika 26. Titracijske i derivacijske krivulje određivanja komercijalnih proizvoda sa CPC ($c=4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) kao titrant koristeći senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije.

Tablica 6. Statistika određivanja komercijalnih proizvoda sa CPC ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) kao titrant koristeći senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije

Uzorak	Dodana količina uzorka V/mL	Pronađena koncentracija anionskog tenzida/M
Ajax Lilac breeze	1	$2,97 \cdot 10^{-2}$
Ajax Spring flowers	1	$3,07 \cdot 10^{-2}$
Arf (cream)	1	$5,14 \cdot 10^{-3}$
Clin (lemon)	1	$6,43 \cdot 10^{-3}$

Potenciometrijskom titracijom također je određena koncentracija kationskog tenzida u sredstvu za čišćenje kupaonica Cilit Bang®. Koncentracija iznosi $3,41 \cdot 10^{-3}$ M. Na slici 27 prikazane su titracijska i derivacijska krivulja.



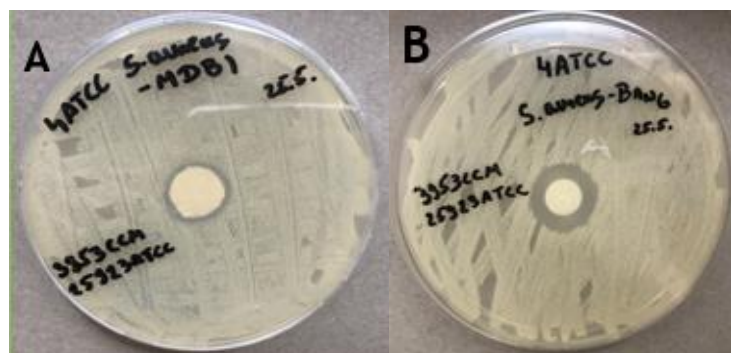
Slika 27. Titracijska i derivacijska krivulja određivanja kationskog tenzida u Cilit Bangu® sa SDS ($c = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L) kao titrant koristeći senzor MJ-12-TPB kao detektor završne točke titracije.

4.5. Provjera antimikrobne aktivnosti

Tablica 7. Izmjerene koncentracije i volumeni za kationske tenzide te koncentracije odabranih mikroorganizama

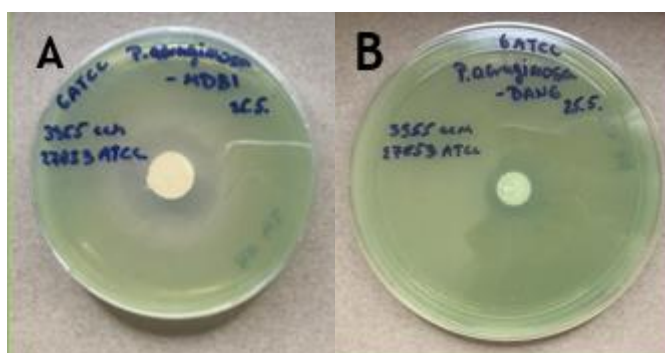
SOJ	c/CFU mL ⁻¹	V(MDBI-Br)/ mL c(MDBI-Br) = 0.250 M	V(Cilit BANG)/mL c(kationski tenzid) = 3,41·10 ⁻³ M*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,9·10 ⁸	0,3	-
	1,9·10 ⁸	-	0,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2·10 ⁸	0,3	-
	1,2·10 ⁸	-	0,3
<i>Aspergillus niger</i>	1·10 ⁸	0,3	-
	1·10 ⁸	-	0,3
<i>Escherichia coli</i>	1,1·10 ⁸	0,3	-
	1,1·10 ⁸	-	0,3
<i>Candida albicans</i>	0,4·10 ⁸	0,3	-
	0,4·10 ⁸	-	0,3

Staphylococcus aureus je gram pozitivna, mezofilna okrugla bakterija koja se nalazi se u gornjem djelu respiratornog trakta i na koži kao normalna flora čovjeka. Vrlo važna jer je otporna na mnoge dezinficijense i antibiotike, a može lučiti toksine od kojih dolazi do trovanja hranom. [17] Zona inhibicije za novi kationski tenzid MDBI iznosi 12 mm, a za kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® iznosi 25 mm. Zone inhibicija su vidljive na slici 28. MDBI kao antimikrobni agens (A) s lijeve strane te kationski tenzid u dezinfekcijskom sredstvu Cilit BANG® (B) s desne strane.



Slika 28. Usporedba zona inhibicija za antimikrobni agens MDBI (A) i kationski tenzid u sredstvu Cilit Bang® (B) na *Staphylococcus aureus*.

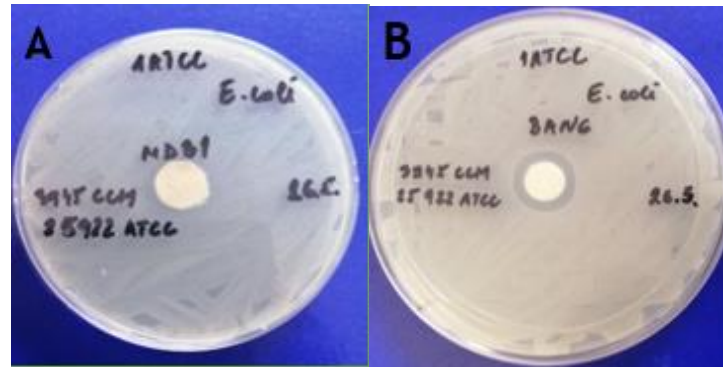
Pseudomonas aeruginosa je gram negativna, štapičasta bakterija koja je prepoznatljiva po specifičnoj zelenoj boji na agaru i mirisu lipe. Posjeduje urođenu rezistentnciju na antibiotike i česta je bolnička bakterija, uzrokuje mnoge infekcije povezane s visokom stopom smrtnosti. [18] Izmjerena zona inhibicije za novi kationski tenzid MDBI iznosi 30 mm i jasno je izražena. Za kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® iznosi 20 mm te nije jasno izražena. Zone inhibicija su vidljive na slici 29. MDBI kao antimikrobni agens (A) s lijeve strane te kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® (B) sa desne strane.



Slika 29. Usporedba zona inhibicija za antimikrobni agens MDBI (A) i kationski tenzid u sredstvu Cilit Bang® (B) na *Pseudomonas aeruginosa*.

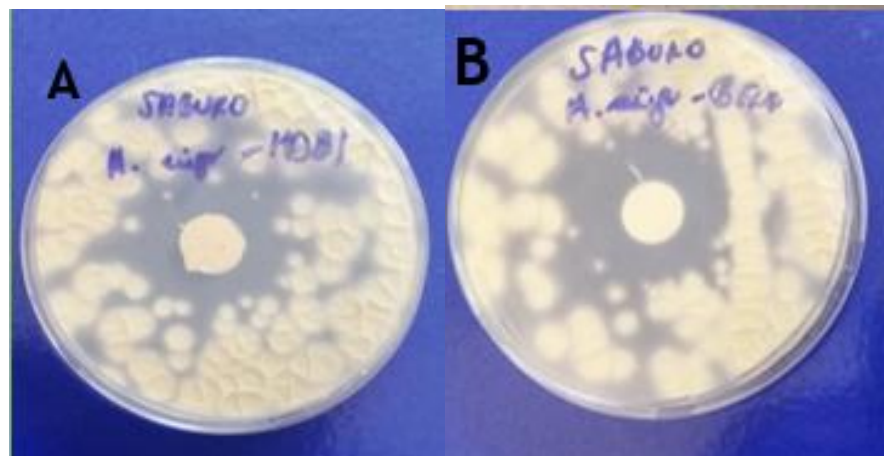
Escherichia coli je štapičasta gram-negativna bakterija koja živi u crijevima zdravih ljudi i životinja. Kod prevelike izloženosti mogu izazvati crijevne tegobe te je jedna od najčešćih uzročnika upala mokraćnog sustava. [19]

Zona inhibicije za novi kationski tenzid MDBI iznosi 12 mm, dok za kationski tenzid u komercijalnom sredstvu Cilit BANG® iznosi 21 mm. Zone inhibicija su vidljive na slici 30. MDBI kao antimikrobni agens (A) s lijeve strane te kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® (B) s desne strane.



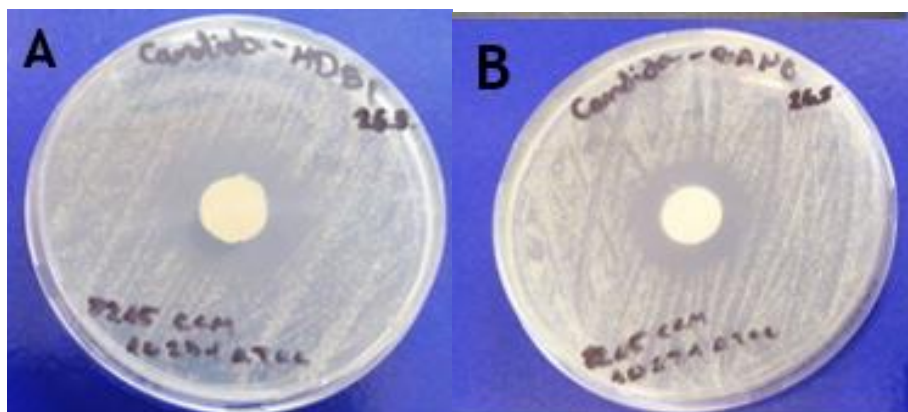
Slika 30. Usporedba zona inhibicija za antimikrobni agens MDBI (A) i kationski tenzid u sredstvu Cilit Bang® (B) na *Escherichia coli*.

Aspergillus niger je crna plijesan, česti zagađivač hrane koji uzrokuje truljenje [20]. Zona inhibicije za novi kationski tenzid MDBI iznosi 30 mm, a za kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® iznosi 35 mm. Zone inhibicija su vidljive na slici 31. MDBI kao antimikrobni agens (A) s lijeve strane te kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® (B) sa desne strane.



Slika 31. Usporedba zona inhibicija za antimikrobni agens MDBI (A) i kationski tenzid u sredstvu Cilit Bang® (B) na *Aspergillus niger*.

Candida albicans je gljivica koja je prirodni stanovnik kod ljudi no njezino pretjerano razmnožavanje može dovesti do kandidijaze [20]. Zona inhibicije za MDBI iznosi 33 mm, dok za kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® iznosi 27 mm. Na slici 32 vidi se djelovanje MDBI kao antimikrobni agens (A) s lijeve strane te kationski tenzid u sredstvu Cilit BANG® (B) s desne strane.



Slika 32. Usporedba zona inhibicija za antimikrobni agens MDBI (A) i kationski tenzid u sredstvu Cilit Bang® (B) na *Candida albicans*.

5. Zaključak

Ispitivanjem karakteristika tenzidnog senzora s aktivnom komponentom 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazolijevim tetrafenilboratom (MDBI-TPB) koja u senzoru služi kao ionofor, može se zaključiti da sensor pokazuje točnost, preciznost i jednostavnost. Senzor je pokazao izvrsne odzivne karakteristike na anionske i kationske tenzide. Najbolji odziv pokazuje na anionski tenzid SDS s nagibom od -54,999 mV/dekadi, dok je to za kationski tenzid CPC čiji nagib iznosi 53,346 mV/dekadi. Senzor pokazuje široko upotrebljivo koncentracijsko područje za anionske i kationske tenzide. Titracijske krivulje modelnih uzoraka imale su sigmoidalan oblik i izrazitu promjenu signala u točki ekvivalencije. Titracijske krivulje na tri koncentracijska nivoa za uzorke vode iz potoka pokazale su sigmoidalan oblik i kod vrlo niskih koncentracija što omogućava očitavanje završne točke. Potenciometrijskom titracijom uspješno su određene i koncentracije kationskih i anionskih tenzida u komercijalnim proizvodima.

Antimikrobno djelovanje novog 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-benzo[*d*]imidazolijevog kationskog tenzida (MDBI) na 5 odabranih mikroorganizama pokazalo je da MDBI uspješno inhibira rast: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Aspergillus niger*, a manje zone inhibicije pokazuje za: *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Usporedbom zona inhibicije za MDBI i komercijalnog sredstva za čišćenje kupaonica Cilit BANG®, MDBI je pokazao superiornost u inhibiciji *Pseudomonas aeruginosa*, gram negativnu bakteriju koja je rezistentna na uobičajene antimikrobne agense.

6. Literatura

1. M. Jozanović, N. Sakač, M. Karnaš, M. Medvidović-Kosanović, *Crit Rev Anal Chem.* 51(2) (2021), 115–137.
2. Ö. Isildak, O. Özbek, *Crit Rev Anal Chem.* 51(3) (2021), 218–231.
3. M.H. Al-Sayah, *J Water Health* 18(5) (2020), 843–848.
4. S. Papić, *Deterdženti*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije sveučilišta u Zagrebu, 2015.
5. B.E. Rapp, *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*, Elsevier, Njemačka, 2017.
6. P.L. Keen, M.H.M.M. Montforts, *Antimicrobial Resistance in the Environment*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2011.
7. M.C. Jennings, K.P.C. Minbiole, W.M. Wuest, *ACS Infect Dis.* 1 (2016), 288–303.
8. D.B. Vieira, A.M. Carmona-Ribeiro, *J Antimicrob Chemother.* 58 (2006), 760–767.
9. J.L. Cumming, D.W. Hawker, K.W. Nugent, H.F. Chapman, *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 43 (2008), 113–117.
10. N. Sermek, *Sinteza i biološke aktivnosti imidazolnih soli*, Diplomski rad, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2021.
11. L. Kanis, Ispitivanje odzivnih karakteristika ionsko-selektivne elektrode modificirane nanočesticama, Diplomski rad, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2017.
12. M. Hajduković, *Određivanje anionskih tenzida u realnim sustavima metodom injektiranja u protok*, Specijalistički rad, Odjel za kemiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2016.
13. M. Hajduković, M. Samardžić, O. Galović, A. Széchenyi, M. Sak-Bosnar. *Sens Actuators B Chem.* 251 (2017), 795–803.
14. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print – Tiskara Hrastić, Zagreb, 2010.
15. M. Sak-Bosnar, D. Madunić-Čačić, N. Sakač, O. Galović, *Electrochim Acta.* 55 (2009), 528–534.
16. M. Bubonja, M. Mesarić, A. Miše, M. Jakovac, M. Abram, *Medicina.* 44 (2008), 280-284.
17. M.C. Jennings, K. P. C. Minbiole, W.M. Wuest, *ACS Infectious Diseases* 1 (2015) 288–303.
18. M. Gužvinec, I. Butić, M. Jelić, S. Bukovski, S. Lucić, i A. Tambić Andrašević, *Infektološki glasnik*, 32 (2012), 71-80. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/98104>

19. S. Karimi, F. Azizi, M. Nayeb-Aghaee, & L. Mahmoodnia, *Electronic Physician*, 10(3) (2018) 6548–6553. <https://doi.org/10.19082/6548>
20. C.N. Powers, P. Satyal, J.A. Mayo, H. McFeeters, & R.L. McFeeters, *Molecules*, 24(16) (2019), 2868. <https://doi.org/10.3390/molecules24162868>

7. Životopis

Osobni podatci

Ime i prezime: Dora Tot

Datum rođenja: 6. listopada 1998.

Mjesto rođenja: Čakovec

Obrazovanje

2005-2013 Osnovna škola Domašinec

2013-2017 Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec

2017-2020 Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Odjel za kemiju,
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018 22. Smotra Sveučilišta J.J. Strossmayera

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

2022 ISC GREEN 2022

2022 Water for all