

Utjecaj koncentracije otopine prekursora na biosintezu nanočestica željeza primjenom biljnog ekstrakta melise (*Melissa officinalis*) kao biokatalizatora

Majetić, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:663802>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Marta Majetić
0058218586**

**UTJECAJ KONCENTRACIJE OTOPINE
PREKURSORA NA BIOSINTEZU NANOČESTICA
ŽELJEZA PRIMJENOM BILJNOG EKSTRAKTA
MELISE (*Melissa officinalis*) KAO BIOKATALIZATORA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija prahova

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Benković

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za Procesno inženjerstvo
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj koncentracije otopine prekursora na biosintezu nanočestica željeza primjenom biljnog ekstrakta melise (*Melissa officinalis*) kao biokatalizatora

Marta Majetić, 0058218586

Sažetak:

Jedan od zadataka nanotehnologije je sinteza nanočestica, čestica u rasponu 1 – 100 nm. Kod postupka biosinteze, kao katalizatori se mogu koristiti biljke, gljive ili drugi biološki materijali. Cilj rada bio je ispitati utjecaj koncentracije prekursora, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, na biosintezu nanočestica željeza. Korišteni biokatalizator je vodeni ekstrakt melise. Melisa je bogata fitokemikalijama, poput fenolnih tvari, koje se troše za provedbu biosinteze. To je dokazano mjerenjem ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktu i otopinama prekursora. Svojstva smjese i otopina okarakterizirana su mjerenjem boje, pH te električne vodljivosti. Sintetiziranim nanočesticama određeni su hidrodinamički promjer, boja i masa, dok su spektrofotometrijskim metodama identificirani karakteristični pikovi za otopine prekursora kao i reakcijske smjese. Dokazano je da je najviše sintetiziranih nanočestica iz prekursora najveće koncentracije (0,1 M) kao i da se povećanjem otopine prekursora troši više polifenola za biosintezu.

Ključne riječi: biosinteza, nanočestice, željezo, *Melissa officinalis*

Rad sadrži: 35 stranica, 15 slika, 4 tablice, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Benković

Datum obrane: 05. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Process Engineering
Section for Fundamental Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Effect of precursor concentration on biosynthesis of Iron nanoparticles by application Melissa
extract (*Melissa officinalis*) as biocatalyst

Marta Majetić, 0058218586

Abstract:

One of the main tasks in nanotechnology is the synthesis of nanoparticles, particles in the size range 1 – 100 nm. In biosynthesis, biocatalysts can be plants, fungi or other biological materials. The aim of this thesis was to investigate the effect of the precursor concentration, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, on iron nanoparticle biosynthesis. An aqueous melissa extract was used as a biocatalyst. Melissa is rich in phytochemicals, such as phenolic compounds, which are necessary for the implementation of biosynthesis. That was proved by determining total phenolic content and antioxidant capacity. Properties of mixtures and solutions were characterized by measuring color, pH and electrical capacity. On synthesized nanoparticles were determined hydrodynamic diameter, color and mass, while using spectrophotometric methods were found characteristic peaks of solutions and mixtures. It was determined that with the highest precursor concentration (0,1 M) synthesized the most nanoparticles and with increasing precursor concentration, more polyphenols were used for biosynthesis.

Keywords: biosynthesis, nanoparticles, iron, *Melissa officinalis*

Thesis contains: 35 pages, 15 figures, 4 tables, 36 references

Original in: Croatian

Thesis deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Maja Benković, PhD

Thesis defended: July 5, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. MELISA	2
2.2. SINTEZA NANOČESTICA.....	2
2.2.1. Biosinteza nanočestica.....	3
2.3. PRIMJENA NANOČESTICA ŽELJEZA.....	5
2.3.1. Primjena u agronomiji	5
2.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji	6
2.3.3. Primjena u farmaceutskoj industriji	7
2.4. UTJECAJ REAKCIJSKIH UVJETA NA SINTEZU NANOČESTICA ŽELJEZA	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Reagensi.....	9
3.1.2. Pribor	9
3.1.3. Aparatura	10
3.2. METODE.....	10
3.2.1. Priprema ekstrakta melise	10
3.2.2. Priprema otopine prekursora.....	10
3.2.3. Sinteza nanočestica željeza	11
3.2.4. Boja.....	11
3.2.5. Vodljivost.....	11
3.2.6. pH	11
3.2.7. Kontinuirani UV spektar.....	11
3.2.8. Kontinuirani NIR spektar.....	11
3.2.9. FTIR spektar	12

3.2.10. Određivanje hidrodinamičkog promjera metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti..	12
3.2.11. Izdvajanje nanočestica iz otopine.....	12
3.2.12. Određivanje ukupnih polifenola u supernatantu i polaznom ekstraktu	12
3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u supernatantu i polaznom ekstraktu DPPH metodom.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1. SVOJSTVA OTOPINE PREKURSORA.....	15
4.2.SVOJSTVA REAKCIJSKIH SMJESA	17
4.3. SVOJSTVA SINTETIZIRANOG NANOPRAHA.....	19
4.4. UV, NIR I FTIR SPEKTROSKOPIJA.....	22
4.5. UKUPNI POLIFENOLI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	27
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. LITERATURA	31

1. UVOD

Zelena sinteza nanočestica se temelji na sintezi u kojoj sudjeluju prekursor i određena vrsta biološkog materijala, pri čemu biološki materijali imaju ulogu katalizatora (Benković i sur., 2023). Kod zelene sinteze najčešće korišteni materijali su biljni ekstrakti, razne bakterije, kvasci, alge ili gljive koji su bogati bioaktivnim komponentama potrebnima za sintezu, poput polifenola. Zelena sinteza je ekološki prihvatljiva jer se pri takvoj sintezi ne upotrebljavaju toksične i skupe kemikalije. Globalni problem današnjice je upravo zaštita okoliša. Jedni od glavnih uzročnika onečišćenja su teški metali koji se nalaze u brojnim kemikalijama (Mahanty i sur., 2019a; Mahanty i sur., 2019b). Osim štetnih kemikalija koje se u biosintezi ne koriste, ovakav pristup sintezi je ekonomičniji jer ne traži primjenu visokog tlaka, velike količine energije i visoke temperature (KSV i sur., 2017). Tlak koji se primjenjuje je atmosferski, a reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Nanočestice imaju primjenu u brojnim granama – agronomija, medicina, kozmetička i farmaceutska industrija i brojne druge. Na samu veličinu čestica nakon sinteze utječe odabir prekursora, koji je najčešće sol (Huston i sur., 2021), a najčešće zabilježene veličine nanočestica sintetiziranih zelenim putem kreću se u rasponu 1 – 100 nm. Svojstva ovih nanočestica su u nekim parametrima bolja od nanočestica sintetiziranih fizikalnim ili kemijskim putem (KSV i sur., 2017). Tako mala veličina im daje veći omjer površine i volumena. To će se pokazati poželjnim svojstvom u daljnjoj primjeni jer su takve čestice katalitički aktivnije od čestica koje imaju manji odnos površine i volumena. Kod čestica sintetiziranih ovim putem ne dolazi do značajne agregacije molekula kao što je to slučaj kod drugih vrsta sinteze (Mahanty i sur., 2019a).

Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj koncentracija prekursora na biosintezu nanočestica željeza uz ekstrakt melise kao biokatalizatora. Prekursor koji je korišten je željezov (III) klorid heksahidrat. Ukupno je bilo ispitano pet koncentracija otopina prekursora (0,1 M, 0,075 M, 0,05 M, 0,025 M i 0,01 M). Za sintezu nanočestica koristio se vodeni ekstrakt melise (*Melisa officinalis*). Biosinteza se pratila određivanjem količine polifenola koji se troše za sintezu, vaganjem nastalog taloga nanočestica i spektrofotometrijskim metodama. Također su određeni fizikalno - kemijske karakteristike polaznih otopina, reakcijskih smjesa i sintetiziranih čestica.

2. TEORIJSKI DIO

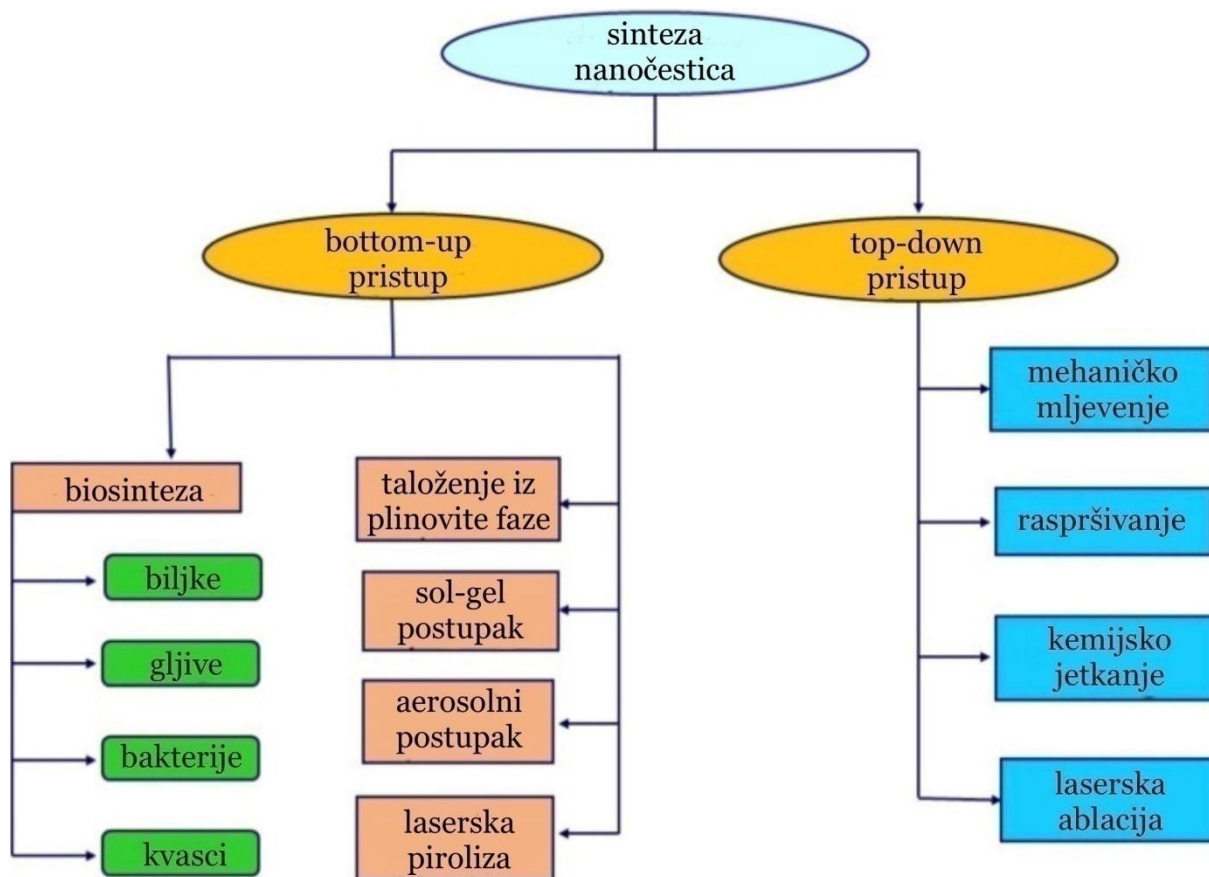
2.1. MELISA

Melissa officinalis, poznata još i pod nazivima melisa i matičnjak, višegodišnja je biljka iz porodice usnača. Prirodno raste na pjeskovitom tlu no zbog svoje se prilagodljivosti može uzgajati na raznim područjima. Također, ova biljka raste na svim nadmorskim visinama (Miraj i sur., 2017). Visina koju postiže je obično u rasponu 30 cm – 125 cm. Na površini svih dijelova biljke rastu kratke dlačice. Stabljika je uspravna i razgranata. Lišće je ovalnog oblika, dužine do 6 cm i širine do 3 cm, na vrhovima su listovi nazubljeni. Cvjetovi su bijele ili ružičaste boje. Tijekom zime, nadzemni dio biljke odumre te iz korijena koji je vrlo razgranat nikne novi nadzemni dio. Biljka najbolje raste pri temperaturama 15 - 35 °C uz količinu kiše 500 – 600 mm po m² tijekom rasta (Shakeri i sur., 2016). Pretežito je rasprostranjena na Mediteranu te u zapadnim dijelovima Azije. U tradicionalnoj medicini našla je primjenu kod raznih bolesti i tegoba poput bronhitisa, astme, srčanih aritmija, epilepsije, snižavanja tjelesne temperature, depresije, nervoze, glavobolje, anemije, problema sa spavanjem i pamćenjem (Miraj i sur., 2017). Danas su brojna farmakološka ispitivanja potvrdila dobrobiti melise čije je djelovanje antioksidativno, antimikrobno i antikancerogeno, djeluje kao antidepresiv i sprječava upale. Zbog povoljnog djelovanja na organizam i bogatog kemijskog sastava, melisa je našla primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, a pretežito se koristi eterično ulje melise (Shakeri i sur., 2016).

Istraživanja su pokazala da su u melisi su prisutni terpeni spojevi – monoterpeni, triterpeni i seskviterpeni. Terpeni su spojevi građeni od izoprenskih jedinica. Također su prisutne i fenolne tvari poput flavonoida, tanina i fenolnih kiselina (Shakeri i sur., 2016). Od fenolnih kiselina prisutne su ružmarinska, kava kiselina i protokatehinska kiselina. Monoterpeni spojevi su monoterpeni aldehydi i glikozidi, u triterpenske spojeve ubrajaju se ursolična i oleantolična kiselina. U svježem listu, sušenom listu i vodenom ekstraktu nisu prisutne iste tvari. To omogućuje različitu primjenu s obzirom na prisutnost željenih komponenti. U ekstraktu lista matičnjaka prevladavaju derivati hidroksicimene kiseline, flavonoidi s kava kiselinom, m-kumarinska kiselina, ružmarinska kiselina i flavonoidni glikozidi. Fenolne komponente u ekstraktu se izražavaju u ekvivalentima galne kiseline (Miraj i sur., 2017).

2.2. SINTEZA NANOČESTICA

Nanotehnologija se bavi sintezom, karakterizacijom i primjenom nanočestica, koje su u rasponu veličina 1 nm – 100 nm. Sinteza nanočestica može se odvijati na dva načina – "bottom-up" i "top-down" procesima (Hussain i sur., 2016).



Slika 1. Podjela sinteze na top-down i bottom-up pristup (Jadoun i sur.,

"Top-down" pristup temelji se na smanjivanju većih čestica do čestica nano veličina. Čestice se mogu smanjivati sljedećim postupcima: procesiranje laserskim zrakama, mehaničko mljevenje i rezanje materijala. U mliječnoj industriji se koristi i postupak homogenizacije kao jedan od oblika "top-down" pristupa. Pozitivne strane su to što se veličina čestica primjenom ovog postupka može kontrolirati putem podešavanja pH vrijednosti, temperature i vremena provedbe. U ovim postupcima ne dolazi toliko do kontaminacije. S druge strane, cijena uređaja je vrlo visoka, a često se upotrebljavaju i kemikalije koje su štetne za okoliš (Benković i sur., 2023).

"Bottom-up" pristup se temelji na spajanju atoma i molekula u nakupine većih dimenzija. Materijali mogu biti u plinovitom, tekućem i krutom agregatnom stanju. Ovakva se sinteza može odvijati u aerosolu, u sol-gel fazi, laserskom pirolizom, atomskom i molekularnom kondenzacijom te raznim drugim postupcima među kojima je i zelena sinteza ili biosinteza (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

2.2.1. Biosinteza nanočestica

Popularno nazvana "zelena kemija" krenula se istraživati i primjenjivati početkom 21.

stoljeća. Cilj zelene kemije je pronaći zamjene za štetne kemikalije kako bi se smanjilo zagađenje okoliša. Upravo su se tradicionalnim metodama sinteze nanočestica koristile štetne kemikalije, ali se danas to može zamijeniti biosintezom nanočestica. Biosinteza uz to što je prihvatljiva za okoliš je i ekonomičnija i sigurnija za provedbu od tradicionalnih metoda (Jadoun i sur., 2021).

Za provedbu zelene sinteze nanočestica mogu se koristiti biljke, alge, kvasci, gljive, bakterije i drugi jednostanični i višestanični organizmi (Ebrahiminezhad i sur., 2018; Jadoun i sur., 2021). Biljke su jeftine i jednostavno se održavaju pa tako predstavljaju idealan izbor za biosintezu. S druge strane, biljke mogu sadržavati teške metale i druge štetne spojeve koji su prisutni u okolišu. Pozitivna strane uporabe biljaka je to što je priprema za biosintezu vrlo brza i jednostavna (Jadoun i sur., 2021). U početku su se koristile žive biljke no sintetizirane čestice nisu bile jednolične u veličini i obliku zbog uporabe različitih biljnih tkiva i organa. Također, izolacija nanočestica iz biljaka se nije pokazala primjenjivom uslijed niske čistoće nanočestica. Biljni ekstrakt se pokazao najboljim načinom provedbe biosinteze iz biljaka. Ovaj način provedbe je vrlo jednostavan, brzo dolazi do sinteze i lako je primjenjiv je u industriji. Dijelovi biljke nemaju isti kemijski sastav pa se iz svakog biljnog tkiva ili organa mogu dobiti ekstrakti različitog sastava. Ekstrakti se pripremaju najčešće iz lista, ali se mogu pripremati i iz sjemenaka, plodova, kore, korijena, cvijeta i ostalih dijelova (Ebrahiminezhad i sur., 2018). U ekstraktima se nalaze fitokemikalije koje su prirodan izvor reducirajućih i stabilizirajućih sredstava pa kao takvi zamjenjuju štetne i skupe kemikalije. Uvjeti pri kojima se najčešće provodi biosinteza su atmosferski tlak i sobna temperatura (Jadoun i sur., 2021).

Provedba biosinteze nanočestica uporabom gljiva i bakterija je u odnosu na uporabu biljaka nešto kompliciranija. Naime, potrebno je osigurati aseptičke uvjete, biomasa mora biti pripremljena. Provedba biosinteze može biti intracelularna ili ekstracelularna. Kod intracelularnog mehanizma potrebno je izdvojiti nanočestice iz intracelularnog prostora i očistiti ih što je dodatan korak u proizvodnji. Pozitivna strana algi je njihov brzi rast, posebno zelenih, crvenih i smeđih algi pa su povoljan materijal za biosintezu koja je slična provedbi sintezi iz biljaka. Za sintezu je potrebno pripremiti ekstrakt, pomiješati s otopinom prekursora i ostaviti smjesu pri prethodno određenim reakcijskim uvjetima – brzina miješanja, vrijeme trajanja inkubacije, optimalni pH i temperatura (Benković i sur., 2023). Općenito je za biosintezu iz biljnog materijala potrebno pripremiti ekstrakt. Vodeni ekstrakt se priprema iz željenog dijela biljke, zagrijavanjem vode do optimalne temperature uz miješanje. Potrebno je provesti filtraciju kako bi se kruti ostatak odvojio od tekućine. Otopina prekursora se dodaje u optimalnoj koncentraciji. ukoliko se žele sintetizirati nanočestice željeza prekursor može biti

FeCl₃, za sintezu srebra to može biti AgNO₃ i tako dalje. Kada se ekstrakt i prekursor pomiješaju doći će do promjene boje što je indikator da je došlo do sinteze. Nakon određenog vremena, smjesa se centrifugira kako bi se odvojile nanočestice od tekuće faze. Talog je potrebno osušiti i slijedi karakterizacija sintetiziranih nanočestica. Karakterizacija se provodi brojnim analizama poput FTIR, NIR, UV-Vis spektroskopije, SEM i TEM mikroskopija i brojnih drugih metoda (KSV i sur., 2017).

Biosintetizirane nanočestice imaju primjenu u raznim poljima. Između ostaloga, primjenjuju se u medicini zbog svojih antibakterijskih, antivirusnih i antifungalnih svojstava, tretiranju tla i biljaka u poljoprivredi, kod proizvodnje električnih uređaja, primjenjuju se kao katalizatori, u biotehnologiji i proizvodnji polimera (Huston i sur., 2021; Spanos i sur., 2021; Sharifi i sur., 2017; Hussain i sur., 2016). Nanočestice oštećuju membranu i stijenku bakterije, mogu stvarati slobodne radikale što će dovesti do uništenja bakterijske stanice. Tako je i utvrđeno da biološki sintetizirane nanočestice srebra uništavaju viruse u vodi, a također mogu i prevenirati infekciju HIV virusom. Nanočestice željeza su također pronašle primjenu u dezinfekciji voda te vezanju teških metala iz tla. Smatra se kako bi površine s raznim nanočesticama mogle zamijeniti kemijska sredstva za pročišćavanje voda. Primjena je moguća i u poljoprivredi gdje nanočestice mogu zamijeniti gnojiva i pesticide (Hussain i sur., 2016).

2.3. PRIMJENA NANOČESTICA ŽELJEZA

Nanočestice željeza su zbog svojih magnetnih svojstva, visoke stabilnosti, dobre adsorpcije i niske toksičnosti postale primjenjivane u raznim poljima. Tako su primjenu našle u agronomiji, obradi voda, biomedicini, očuvanju okoliša i brojnim drugim područjima (Spanos i sur., 2021). U prehrambenoj industriji svoju su primjenu našle u analizi hrane, pročišćavanju proteina i imobilizaciji enzima, dok se u farmaceutskoj industriji koriste u dijagnostici i liječenju bolesti, (Attia i sur., 2022; Cao i sur., 2012).

2.3.1. Primjena u agronomiji

Otpadne vode agronomskih industrija vrlo su kompleksnog sastava, u njoj se mogu pronaći kontaminanti organskog i anorganskog podrijetla uključujući pesticide, herbicide, teške metale i antibiotike. Svi ovi spojevi i u vrlo niskim koncentracijama mogu uzrokovati brojne respiratorne i kardiovaskularne probleme, alergije, ali i trajna oštećenja pojedinih tkiva i organa. Nanočestice zbog svojih malih dimenzija (1 nm – 100 nm) imaju veliku površinu. To ih svojstvo čini dobrim adsorbensima, te stoga mogu adsorbirati teške metale, antibiotike i pesticide iz otpadnih voda. Adsorpcija se ostvaruje uspostavom vodikovih veza, metalnih veza i uspostavom brojnih elektrostatskih interakcija. Prema literaturnim podacima,

nanočestice željeza, točnije Fe_3O_4 uspješno adsorbiraju većinu olova iz vodenog medija zagađenog olovom, više od 85 % (Spanos i sur., 2021).

Antibiotici i pesticidi se koriste u velikoj mjeri u poljoprivredi. Oni nisu biorazgradivi te se osim u otpadnoj vodi nakupljaju i u tlu. Tako će se kontaminirati biljke koje će biti posađene na tom mjestu, bez da će biti tretirane pesticidima ili antibioticima. Ovi se spojevi također izdvajaju adsorpcijom, a veze koje se uspostavljaju su elektrostatske interakcije, hidrofobne i akceptor-donor interakcije (Spanos i sur., 2021).

Nanočestice mogu i ubrzavati rast biljaka. Nano gnojiva su se pokazala vrlo uspješnim za uzgoj suncokreta. Takva se vrsta gnojiva aplicira prskanjem. Usporedbom suncokreta koji nije bio tretiran nanočesticama željeza i tretiranog suncokreta, tretirani suncokret je bio viši, imao je veći broj listova i veću koncentraciju klorofila. Ustanovljeno je kako su gnojiva na bazi Fe_3O_4 i Fe_2O_3 nešto efikasnija u odnosu na same nanočestice u Fe obliku (Spanos i sur., 2021).

2.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji

Brojni se enzimi koriste u prehrambenoj industriji, poput lipaza, proteaza i oksidoreduktaza. Neki od njih su više osjetljivi na pH i temperaturu. Jednom denaturirani enzim se teško može vratiti u nativnu formu, odnosno više se ne može koristiti. Kako bi enzimi bili stabilniji i kako bi se mogli ponovno koristiti, provode se postupci imobilizacije ili modifikacije enzima. Imobilizacija se provodi pomoću magnetnih nanočestica – nanočestica željeza procesima adsorpcije i stvaranja kovalentnih veza. Između enzima dijela nanočestice može doći do stvaranja kovalentne veze. Pozitivno je to što će se povećati stabilnosti i enzim će se moći ponovno koristiti no doći će do blagog smanjenja aktivnosti enzima. Kod fizikalne adsorpcije stvaraju se vodikove ili ionske veze te van der Waalsove interakcije. Fizikalna adsorpcija je manje učinkovita od imobilizacije jer promjenom uvjeta, temperature i pH dolazi do promjene afiniteta enzima (Cao i sur., 2012).

Separacija i čišćenje proteina vrlo su bitni koraci za izdvajanje enzima. Ovi se postupci osim u prehrambenoj industriji primjenjuju i u biomedicini te u znanstvenim istraživanjima. Za izdvajanje se najčešće koriste ultrafiltracija, kromatografske metode, centrifugiranje, ali i magnetna separacija. Prednosti magnetne separacije nad ostalim metodama su to što kratko traje te može se automatizirati i primjenjivati u industriji na većim količinama. Razlikuju se direktne i indirektne metode. Kod direktnih metoda se na nanočestice veže ligand, a oni se vežu na željene proteine. S druge strane, kod indirektne metode se ligand dodaje u smjesu, tvori kompleks s proteinom i na njih se veže nanočestica željeza koja se također nalazi u toj

smjesi. Za primjenu u industriji vrlo je bitna cijena samog liganda i njegova svojstva. Trebao bi biti jeftin, stabilan i dobro se vezati u kompleks (Cao i sur., 2012).

2.3.3. Primjena u farmaceutskoj industriji

Nanočestice željeza su zbog svojih dobrih optičkih, magnetskih i električnih svojstava, sfernog oblika, biorazgradivosti, visoke stabilnosti i brze sinteze našle široku primjenu u farmaceutskoj industriji. Također, one djeluju antimikrobno, antivirusno i antikancerogeno (Attia i sur., 2022).

Kancerogene bolesti su vrlo zahtjevne za liječenje jer se vrlo razlikuju u napredovanju, liječenju i ponovnom pojavljivanju. Zbog već navedenih svojstava nanočestica željeza primjenjuju se u dijagnosticiranju i liječenju kancerogenih bolesti. Nanočestice željeza se prvenstveno primjenjuju za terapiju hipertermijom, odnosno kako bi se kancerogene stanice uništile uslijed povišene temperature (Alangari i sur., 2022). Nanočestice Fe_3O_4 u kombinaciji s drugim tvarima pokazale dobra citotoksična svojstva protiv kancerogenih stanica jetre. Sam Fe_3O_4 ne može djelovati antikancerogeno. Drugo istraživanje je pokazalo kako nanočestice Fe_2O_3 u kombinaciji s ZnO inhibiraju rast kancerogenih stanica raka dojke. Nanočestice vezanjem na kancerogene stanice uzrokuju pucanje membrane stanica, nakon toga ulaze i stanicu i uništavaju ostale organele (Attia i sur., 2022).

Antivirusno djelovanje pokazale su protiv virusa poput HIV-a, hepatitisa B, gripe, majmunskih boginja te brojnih drugih. Nanočestice uzrokuju trajno oštećenje genoma i onemogućavaju njegovu daljnju replikaciju. Istraživanja su pokazala kako su Fe_2O_3 i Fe_3O_4 pokazali dobre rezultate u uništavanju SARS-CoV-2 virusa, no Fe_3O_4 stvara stabilnije komplekse jer treba manje energije za stvaranje kompleksa (Attia i sur., 2022).

Nanočestice željeza pokazuju i antibakterijsko djelovanje. Naime, bakterije mogu stvarati biofilmove oko svoje stijenke što otežava uništenje stanice. Uz to, takve bakterije se vežu na površine vodikovim vezama, hidrofobnim interakcijama, dipol-dipoli van der Waalsovih interakcijama. Antimikrobni agensi koji se primjenjuju trebaju reducirati stvaranje biofilмова kako bi djelovanje na samu stijenku bilo moguće. Oksidi cinka, aluminija i srebra su pokazali takvo djelovanje, no zbog mogućeg štetnog djelovanja traže se nova rješenja. Tako su nanočestice s magnetnim svojstvima među kojima su i nanočestice željeza - Fe_3O_4 , Fe_2O_3 i $\text{FeO}(\text{OH})$ našle primjenu. Ove nanočestice lako oksidiraju i aglomeriraju što im smanjuje broj funkcionalnih skupina na površini. Kako bi se to izbjeglo, na površinu nanočestica se dodaju polimeri koji mogu biti sintetski ili prirodni (Arakha i sur., 2015).

2.4. UTJECAJ REAKCIJSKIH UVJETA NA SINTEZU NANOČESTICA ŽELJEZA

Reakcijski parametri koji utječu na količinu i svojstva sintetiziranih nanočestica su koncentracija prekursora, koncentracija ekstrakta (biokatalizatora), temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije (Benković i sur., 2023; Ebrahiminezhad i sur., 2018).

pH vrijednost utječe na stabilnost sintetiziranih nanočestica te na njihovu veličinu. Istraživanja su pokazala da niže pH vrijednosti pogoduju stvaranju stabilnijih i manjih nanočestica. Također, utvrđeno je da organske kiseline dodatno stabiliziraju čestice (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Vrijeme je vrlo značajan faktor jer svako odstupanje od optimalnog vremena provođenja ekstrakcije uzrokuje manje iskorištenje ili lošiju kvalitetu ekstrakta. Ukoliko se ekstrakcija provodi prekratko vrijeme, neće doći do maksimalnog izdvajanja komponenti. S druge strane, uslijed predugog provođenja ekstrakcije može doći do degradacije komponenti potrebnih za provođenje biosinteze. Istraživanja su pokazala kako je optimalno vrijeme provođenja ekstrakcije 45 minuta (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Previsoka temperatura također uzrokuje degradaciju antioksidanata. Eksperimentima je utvrđeno da do degradacije dolazi kod temperature više od 80 °C. Rastom temperature od 40 °C do 70 °C dolazi i do rasta antioksidanata u ekstraktu (Ebrahiminezhad i sur., 2018). Optimalna temperatura i pH ovise o samoj vrsti biljke ili nekog drugog biokatalizatora i njegovom kemijskom sastavu (Benković i sur., 2023).

Koncentracija ekstrakta direktno utječe na veličinu sintetiziranih nanočestica željeza. Što je veća koncentracija ekstrakta, veće su nanočestice, ali je i češće je i skupljanje čestica u veće nakupine uslijed jačih veza među njima (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Utjecaj koncentracije prekursora nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je kako koncentracija prekursora utječe na stvaranje nukleusa iz kojih će kasnije nastati nanočestice. No istraživanja su pokazala kako povećanje koncentracije prekursora ne utječe proporcionalno na veličinu čestica nego s povećanjem koncentracije prekursora mogu nastajati i veće i manje nanočestice (Sharifi i sur., 2017). Također, prevelik omjer prekursora i ekstrakta u reakcijskoj smjesi također dovodi do skupljanja čestica u veće nakupine (Benković i sur., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Reagensi

- deionizirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina 98 % ($C_6H_2(OH)_3COOH$) (AcrossOrganics, Geel, Belgija)
- melisa- list, berba 2022., porijeklo biljke Srbija, proizvođač i distributer Suban, Strmec, Hrvatska
- metanol HPLC grade (J.T.Baker, Nizozemska)
- natrijev karbonat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- željezo (III) klorid 6-hidat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, $C_{14}H_{18}O_4$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

3.1.2. Pribor

- Eppendorf epruvete
- Falcon epruvete 15 mL i 50 mL
- kvarcne kivete
- membranski filter (0,2 μm)
- menzura od 5 mL, 25 mL, 500 mL
- metalna spatula
- mikropipete volumena 100 μL , 500 μL i 1000 μL
- odmjerna tikvica od 25 mL
- pipete volumena 5 mL i 10 mL
- plastična štrcaljka
- plastična žlica
- plastični lijevak
- staklena čaša od 25 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL
- staklene epruvete
- staklene tamne reagens boce
- stakleni lijevak

- stakleni štapić
- stalci za epruvete

3.1.3. Aparatura

- analitička vaga (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka)
- digitalni termometar (TP101, HandsOnTech, Malezija)
- eksikator (Normax, Portugal)
- FTIR spektrometar (Spectrum one, PerkinElmer, SAD)
- kolorimetar (PCE-CSM 3, PCE Instruments, Njemačka)
- konduktometar (914 pH/Conductometer, Metrohm, Švicarska)
- Litesizer (Anton Paar, Graz, Austrija)
- magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- mikroskop i kamera (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska)
- NIR spektrometar (AvaSpec-NIR, Avantes, Nizozemska)
- pH-metar (914 pH/Conductometer, Metrohm, Švicarska)
- laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- spektrofotometar (UV1601, Shimadzu, Japan)
- uljna kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- vorteks (Biosan V-1 plus, Riga, Latvija)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ekstrakta melise

Za pripremu vodenog ekstrakta melise odvagano je 12 g osušenog lista melise kojem je dodano 360 mL destilirane vode temperature 80 °C te je smjesa stavljena u uljnu kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen). Ekstrakcija je provođena 30 minuta, uz okretaje miješala 350 min⁻¹. Nakon 30 minuta ekstrakt se profiltrirao najprije pomoću filter papira, a nakon toga preko ChromafilXtra H-PTFE membranskog filtera otvora pora 0,2 µm. Profiltrirani ekstrakt skladišten je u frižideru pri 4-6 °C do daljnjih analiza.

3.2.2. Priprema otopine prekursora

Otopina prekursora pripremljena je otapanjem potrebna količine željezova (III) klorida 6-hidrata u destiliranoj vodi kako bi se dobila je 0,1 M otopina. Iz te polazne otopine

razrjeđivanjem su pripravljene i otopine sljedećih koncentracija – 0,075 M, 0,05 M, 0,025 M i 0,01 M.

3.2.3. Sinteza nanočestica željeza

Sinteza nanočestica željeza pripravljena je miješanjem otopina prekursora i ekstrakta u omjeru 1:4 pri sobnoj temperaturi. Promjena boje reakcijske smjese iz svjetlo žute u tamno plavu/sivu indikator je sinteze nanočestica.

3.2.4. Boja

Boja je određena na kolorimetru (PCE-CSM 3, PCE Instruments, Njemačka) prema Hunter-ovoj skali prema kojoj se određuje 5 parametara (L^* , a^* , b^* , Chroma i Hue), uz prethodnu kalibraciju na bijelu plohu. Uzorak se ulije u kivetu i stavi se na postolje. Pritiskom na gumb prikažu se vrijednosti svih pet parametara. Boja se određuje otopinama prekursora, reakcijskim smjesama prekursora i ekstrakta te sintetiziranim nanočesticama željeza nakon provedenog sušenja.

3.2.5. Vodljivost

Vodljivost se određuje pomoću konduktometra (914 pH/Conductometer, Metrohm, Švicarska) uranjanjem sonde u otopinu. Mjerenje se provodi 3 puta.

3.2.6. pH

pH vrijednost svih uzoraka određena je pomoću pH-metra (914 pH/Conductometer, Metrohm) čija se sonda uroni u epruvetu. Mjerenje se provodi 3 puta.

3.2.7. Kontinuirani UV spektar

Kako bi snimanje kontinuiranog UV spektra bilo moguće, potrebno je napraviti razrijeđene otopine prekursora i smjese prekursora i ekstrakta. U oba su slučaja napravljena 100X razrjeđenja. Dobiveni uzorak se snima u kvarcnoj kiveti koja se stavlja u spektrofotometar. Spektar se snimao na dva spektrofotometra, na UV-VIS spektrofotometru (Biochrom Libra S11, Engleska) su snimljene valne duljine u rasponu 325 nm – 900 nm, dok su na drugom spektrofotometru (UV1601, Shimadzu, Japan) snimljene valne duljine u rasponu 200 nm – 800 nm. Svaki se uzorak snimao tri puta. UV spektar je sniman kako bi se dokazalo prisustvo nanočestica željeza u reakcijskoj smjesi.

3.2.8. Kontinuirani NIR spektar

Za snimanje NIR spektra također je bilo potrebno napraviti 100X razrjeđenje uzoraka. Uzorci su snimani pomoću NIR spektrometar (AvaSpec-NIR, Avantes, Nizozemska) u

rasponu valnih duljina 990 nm – 2500 nm. Za svaki uzorak su provedena tri paralelna mjerenja.

3.2.9. FTIR spektar

Snimanje FTIR spektra provedeno je pomoću uređaja Spectrum one (PerkinElmer, SAD), u rasponu valnih brojeva 4000 cm^{-1} – 450 cm^{-1} . Da bi se mjerenje moglo provesti, uzorke je potrebno tabletirati na način da se pomiješaju sintetizirani prah željeza s kalijevim bromidom u omjeru 1:100. Svaki je uzorak sniman četiri puta.

3.2.10. Određivanje hidrodinamičkog promjera metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti

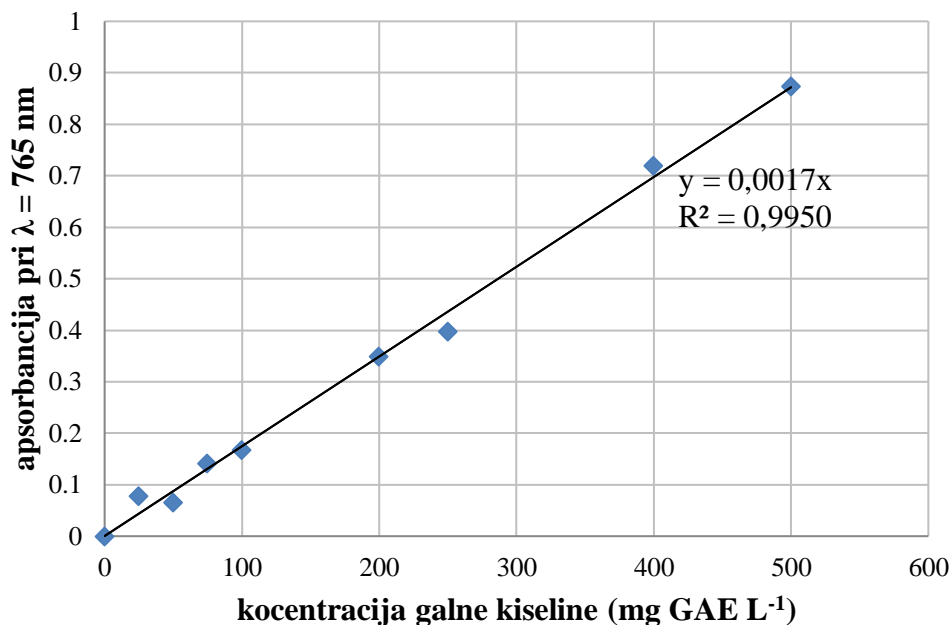
Hidrodinamički promjer nanočestica željeza se određuje na otopinama razrijeđenim 100X. Promjer čestica se određuje na uređaju Litesizer (Anton Paar, Graz, Austrija). Princip mjerenja veličine čestica je mjerenje brzine kojom se čestice gibaju uslijed Brownovog gibanja. Provedena su tri paralelna mjerenja za svaki uzorak.

3.2.11. Izdvajanje nanočestica iz otopine

Iz reakcijske smjese dekantiranjem je odvojen supernatant, a talog koji je zaostao u čašama stavljen je na sušenje u laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska), na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, do konstantne mase. Čaše s talogom su izvagane kako bi se izračunala masa sintetiziranih nanočestica željeza. Osušeni talog se prenio pomoću žlice i metalne spatule u Eppendorf epruvete koje su potom pohranjene u eksikator (Normax, Portugal).

3.2.12. Određivanje ukupnih polifenola u supernatantu i polaznom ekstraktu

Ukupni polifenoli u uzorcima određuju se spektrofotometrijskom metodom uz upotrebu Folin-Ciocalteu reagensa. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska) razrijedi se s vodom u omjeru 1:2 te se pripremi 20 % - tna (w/w) otopina natrijevog karbonata. U epruvetu se otpipetira 3,95 mL destilirane vode, 250 μL otopine Folin-Ciocalteu reagensa, 50 μL uzorka i 750 μL otopine natrijevog karbonata. Nakon dva sata se očitava apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm na spektrofotometru (Biochrom Libra S11, Engleska). Koncentracije polifenola u uzorcima određuju se temeljem jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline koncentracija: 0 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} , 50 mg L^{-1} , 75 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} , 200 mg L^{-1} , 250 mg L^{-1} , 400 mg L^{-1} i 500 mg L^{-1} .



Slika 2. Grafički prikaz baždarnog pravca za određivanje ukupnih polifenola

Na temelju dobivenih podataka jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0017x \quad [1]$$

Gdje su:

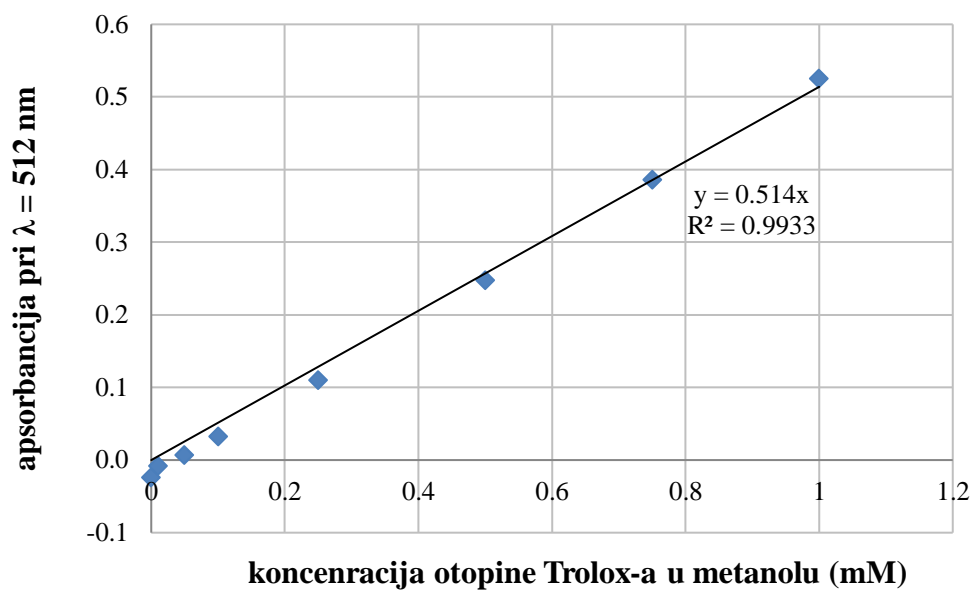
x = koncentracija galne kiseline (mg GAE L⁻¹)

y = apsorbancija pri λ = 765 nm

R² = koeficijent determinacije

3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u supernatantu i polaznom ekstraktu DPPH metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti potrebo je pripremiti 0,094 mM otopinu 1,1-difenil-2-pirilhidrazil radikala, odnosno DPPH. Otpipetira se 3,9 mL otopine DPPH i doda se 100 μL uzorka. Reakcijska smjesa stoji u mraku 30 minuta nakon čega se očita apsorbancija na 512 nm. Koncentracije uzorka očitavaju se temeljem baždarnog dijagrama otopina Trolox-a u metanolu (HPLC grade, J.T.Baker, Nizozemska): 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M i 1 M. Rezultati se izražavaju kao molarni ili maseni udio ekvivalenata Trolox-a.



Slika 3. Grafički prikaz baždarnog pravca za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Na temelju dobivenih podataka jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,514x$$

[2]

Gdje su:

x = koncentracija otopine Trolox-a u metanolu (mM)

y = apsorbanca pri $\lambda = 512$ nm

R^2 = koeficijent determinacije

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj koncentracije prekursora na biokatalitičku sintezu nanočestica željeza. Rezultati su prikazani grafički i tablično. Parametri koji opisuju boju, pH i vodljivost otopina prekursora prikazani su u Tablici 1. Vodljivost, pH i boja reakcijskih smjesa prikazani su u Tablici 2. U Tablicama 3 i 4 nalaze se svojstva sintetiziranog nanoprah, boja i mase. Grafički su prikazani UV, NIR i FTIR spektri otopina prekursora i reakcijskih smjesa, hidrodinamički promjer, količina ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet i mikroskopska slika sintetiziranih nanočestica.

4.1. SVOJSTVA OTOPINE PREKURSORA

Mjerenja pH vrijednosti koja su prikazana u Tablici 1, pokazala su da najniži pH ima 0,1 M otopina prekursora, taj pH iznosi $1,86 \pm 0,06$. Najviši pH ima najrazrjeđenija otopina prekursora (0,01 M), čija pH vrijednost iznosi $2,56 \pm 0,08$. Takvi se rezultati podudaraju s istraživanjem Baumlera i suradnika koji su također dobili najniže pH vrijednosti za najkoncentriraniju otopinu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a najviše vrijednosti za najrazrjeđeniju otopinu navedenog prekursora (Baumler i sur., 2019).

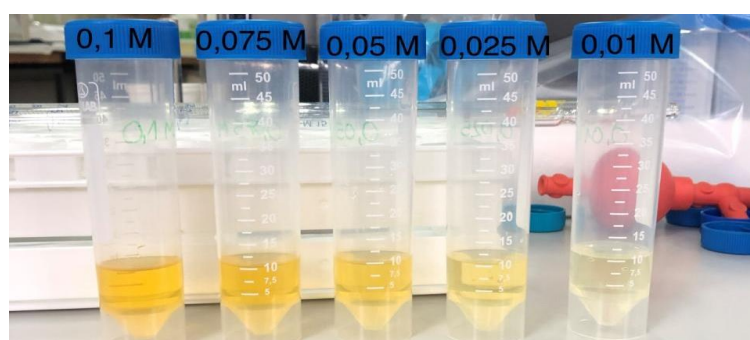
Vodljivost otopina prekursora povećavala se od otopine najmanje koncentracije do otopine najveće koncentracije. Izmjerene vodljivosti prikazane su u Tablici 1, najmanja izmjerena vodljivost iznosi $3,927 \pm 0,12 \text{ mS cm}^{-1}$ dok je najveća vodljivost $24,90 \pm 0,75 \text{ mS cm}^{-1}$. Podaci za vodljivost se podudaraju s istraživanjem Yadava i Yadava (2020) gdje je također uočen porast vodljivosti od najmanje do najveće koncentracije. Do povećanja vodljivosti, uslijed porasta koncentracije, dolazi zbog povećanja broja iona koji mogu provoditi struju (Yadav i Yadav, 2020).

Na Slici 4 prikazane su pripremljene otopine prekursora. Vidljivo je da je otopina prekursora najveće koncentracije (0,1 M) najtamnija, dok je otopina prekursora najmanje koncentracije (0,01 M) najsvjetlija. Vizualna procjena boje prikazana na Slici 4 povezana je s instrumentalnim mjerenjem parametara boje čiji su rezultati prikazani u Tablici 1. Kod parametra L^* , koji se odnosi na svjetlinu uzorka, uočen je pravilan rast. Što je parametar L^* veći, to je uzorak svjetlije boje te što je parametar L^* manji, uzorak je tamniji (Ly i sur., 2020). Do navedenog rasta L^* vrijednosti dolazi zbog smanjenja koncentracije soli u otopini koja doprinosi pojavi žute boje. Usporedbom slike 4 i L^* vrijednosti iz tablice 1 uočena je podudarnost. Kod prekursora najveće koncentracije (0,1 M) L^* vrijednost iznosi $44,39 \pm 1,33$, a kod prekursora najmanje koncentracije (0,01 M) L^* vrijednost iznosi $48,34 \pm 1,45$. Parametar b^* pokazao je trend opadanja od prekursora najveće, prema prekursoru najmanje

koncentracije. Kod prekursora najveće koncentracije (0,1 M) b^* vrijednost iznosi $10,28 \pm 0,31$, a kod prekursora najmanje koncentracije (0,01 M) b^* vrijednost iznosi $7,13 \pm 0,21$. Pozitivnije vrijednosti parametra b^* označavaju žute, dok negativnije vrijednosti parametra označavaju plave tonove (Ly i sur., 2020). Kod parametara a^* , Chroma i hue nije uočen pravilan rast ili pad izmjerenih vrijednosti. Vrijednosti parametara Chroma i hue ovise o vrijednostima parametara a^* i b^* . Parametar a^* opisuje crvene i zelene tonove, pozitivne vrijednosti se odnose na crvene, a negativne vrijednosti na zelene tonove. Chroma opisuje zasićenost boje, a hue opisuje kut kojeg Chroma zatvara (Ly i sur., 2020). Vrijednosti parametara a^* se kreću od $10,61 \pm 0,32$ (0,01 M prekursor) do $12,29 \pm 0,37$ (0,025 M prekursor). Samo parametar b^* pokazuje pravilan trend pa vrijednosti parametra Chroma i hue ne mogu imati pravilan trend. Vrijednosti parametra Chroma se kreću u rasponu od $12,78 \pm 0,37$ za (0,01 M prekursor) do $15,65 \pm 0,47$ (0,025 M prekursor). Vrijednosti parametra hue se kreću od $33,89 \pm 1,02$ (0,01 M prekursor) do $41,46 \pm 1,24$ (0,05 M prekursor).

Tablica 1. pH, vodljivost i boja otopina prekursora

	pH	vodljivost (mS cm ⁻¹)	boja				
			L^*	a^*	b^*	Chroma	hue
0,1 M prekursor	$1,86 \pm 0,06$	$24,90 \pm 0,75$	$44,39 \pm 1,33$	$11,56 \pm 0,35$	$10,28 \pm 0,31$	$14,86 \pm 0,45$	$38,95 \pm 1,17$
0,075 M prekursor	$1,98 \pm 0,06$	$19,90 \pm 0,60$	$44,67 \pm 1,34$	$10,95 \pm 0,33$	$9,70 \pm 0,29$	$14,30 \pm 0,43$	$40,08 \pm 1,20$
0,05 M prekursor	$2,11 \pm 0,06$	$14,35 \pm 0,43$	$46,68 \pm 1,40$	$11,63 \pm 0,35$	$9,34 \pm 0,28$	$15,52 \pm 0,47$	$41,46 \pm 1,24$
0,025 M prekursor	$2,29 \pm 0,07$	$8,166 \pm 0,24$	$47,64 \pm 1,43$	$12,29 \pm 0,37$	$9,20 \pm 0,28$	$15,65 \pm 0,47$	$38,25 \pm 1,15$
0,01 M prekursor	$2,56 \pm 0,08$	$3,927 \pm 0,12$	$48,34 \pm 1,45$	$10,61 \pm 0,32$	$7,13 \pm 0,21$	$12,78 \pm 0,37$	$33,89 \pm 1,02$



Slika 4. Otopine prekursora (vlastita fotografija)

4.2.SVOJSTVA REAKCIJSKIH SMJESA

Reakcijskim smjesama nakon dodatka ekstrakta kao biokatalizatora također su određivane vrijednosti pH i vodljivosti te parametri boje. Vrijednosti mjerenih parametara prikazane su u Tablici 2. Boja reakcijskih smjesa otopina prekursora i ekstrakta prikazana je na Slici 5.

Prema dobivenim rezultatima za pH vrijednosti vidljivo je da reakcijska smjesa pripravljena od ekstrakta i otopine prekursora najviše koncentracija (0,1 M) pokazuje najniže pH vrijednosti ($2,24 \pm 0,07$), dok reakcijska smjesa pripravljena od ekstrakta i otopine prekursora najniže koncentracije (0,01 M) pokazuje najviše pH vrijednosti ($4,67 \pm 0,14$). U odnosu na čiste otopine prekursora, u reakcijskim smjesama je pH viši zbog manje koncentracije soli, odnosno veće koncentracije vode (Baumler i sur., 2019).

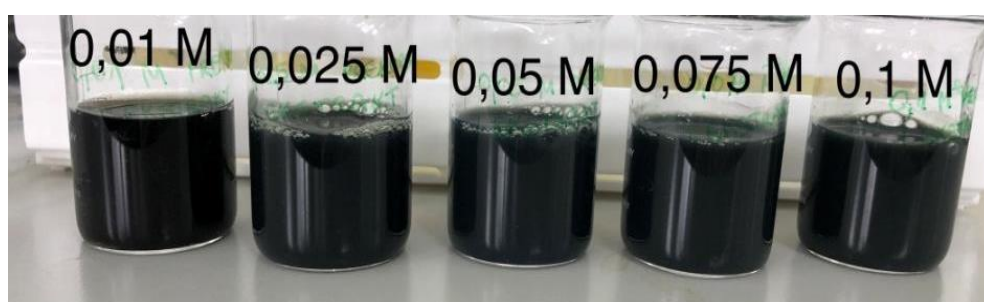
Vodljivost reakcijskih smjesa također pokazuje isti trend kao i čiste otopine prekursora. Najveću vrijednost vodljivosti pokazuje smjesa 0,1 M prekursora i ekstrakta od $9,012 \pm 0,27$ mS cm⁻¹, a najmanju vrijednost pokazuje smjesa 0,01 M prekursora i ekstrakta u vrijednosti od $2,623 \pm 0,08$ mS cm⁻¹. Vodljivost reakcijskih smjesa je manja u odnosu na otopine prekursora jer je u reakcijskim smjesama manja koncentracija iona o kojima ovisi vodljivost (Yadav i Yadav, 2020.).

Sve reakcijske smjese poprimile su tamno zelenu boju, što je vidljivo na Slici 5, te se, prema literaturnim podacima, promjena obojenja reakcijske smjese smatra indikatorom nastanka nanočestica (KSV i sur., 2017). Vrijednosti parametara L^* kretali su se od $30,11 \pm 0,90$ (0,1 M prekursor i ekstrakt) do $31,22 \pm 0,94$ (0,075 M prekursor i ekstrakt). Iz navedenog je vidljivo da su smjese nakon dodatka bioaktalizatora pokazale značajan rast L^* vrijednosti, točnije, da su sintezom nanočestica postale znatno tamnije. Pravilan trend rasta/pada L^* vrijednosti nije utvrđen s promjenom koncentracije otopine prekursora. Jedinu parametru boje koji su pokazali određeni trend u Tablici 2 su parametri a^* i Chroma. Kod navedenih parametara je uočen pad vrijednosti od reakcijske smjese s najvećom koncentracijom prekursora do reakcijske smjese s najmanjom koncentracijom prekursora. Tako se parametar a^* kretao od $5,47 \pm 0,16$ (0,1 M prekursor i ekstrakt) do $4,82 \pm 0,14$ (0,01 M prekursor i ekstrakt). Pozitivnijim vrijednostima parametra a^* pripisuju se crveniji tonovi, dok se negativnijim vrijednostima pripisuju zeleniji tonovi. Oksidi željeza koji nastaju tijekom sinteze su crvene i smeđe boje (Niraimathee i sur., 2016). Prema dobivenim vrijednostima parametra a^* , najviše sintetiziranih oksida željeza, koji su zaslužni za crvene tonove, nastalo je u reakcijskoj smjesi 0,01 M prekursora i ekstrakta. Parametar Chroma se kretao od $5,89 \pm 0,18$ (0,1 M prekursor i ekstrakt) do $5,17 \pm 0,16$ (0,01 M prekursor i ekstrakt). Najizraženiju

boju imala je reakcijska smjesa 0,1 M prekursora i ekstrakta. Parametar Chroma odnosi se na relativnu zasićenost boje (Ly i sur., 2020), te, prema podacima prikazanim u tablici, zasićenost boje opada u reakcijskim smjesama s otopinama prekursora nižih koncentracija, budući da u tim otopinama postoji manji broj iona koji bi mogli sudjelovati u samoj sintezi. Parametri b^* i hue nisu pokazali pravilan trend. Vrijednosti parametra b^* kreću se u rasponu od $1,88 \pm 0,06$ (0,01 M prekursor i ekstrakt) do $2,20 \pm 0,07$ (0,1 M prekursor i ekstrakt). Vrijednosti parametra hue kretale su se od $21,27 \pm 0,64$ (0,1 M prekursor i ekstrakt) do $23,42 \pm 0,70$ (0,025 M prekursor i ekstrakt).

Tablica 2. pH, vodljivost i boja reakcijskih smjesa

	pH	vodljivost (mS cm ⁻¹)	boja				
			L^*	a^*	b^*	Chroma	hue
0,1 M prekursor i ekstrakt	$2,24 \pm 0,07$	$9,012 \pm 0,27$	$30,11 \pm 0,90$	$5,47 \pm 0,16$	$2,20 \pm 0,07$	$5,89 \pm 0,18$	$21,90 \pm 0,66$
0,075 M prekursor i ekstrakt	$2,50 \pm 0,08$	$6,580 \pm 0,20$	$31,22 \pm 0,94$	$5,19 \pm 0,16$	$2,17 \pm 0,07$	$5,62 \pm 0,17$	$22,73 \pm 0,68$
0,05 M prekursor i ekstrakt	$2,92 \pm 0,09$	$4,565 \pm 0,14$	$30,70 \pm 0,92$	$4,96 \pm 0,15$	$2,04 \pm 0,06$	$5,36 \pm 0,16$	$22,37 \pm 0,67$
0,025 M prekursor i ekstrakt	$3,79 \pm 0,11$	$3,134 \pm 0,09$	$30,94 \pm 0,93$	$4,95 \pm 0,15$	$2,14 \pm 0,6$	$5,39 \pm 0,16$	$23,42 \pm 0,70$
0,01 M prekursor i ekstrakt	$4,67 \pm 0,14$	$2,623 \pm 0,08$	$30,31 \pm 0,91$	$4,82 \pm 0,14$	$1,88 \pm 0,06$	$5,17 \pm 0,16$	$21,27 \pm 0,64$



Slika 5. Reakcijske smjese ekstrakta i prekursora (vlastita fotografija)

4.3. SVOJSTVA SINTETIZIRANOG NANOPRAHA

U Tablici 3 prikazane su vrijednosti parametara boje sintetiziranog nanopraha željeza. Mjerene vrijednosti nisu pokazale u potpunosti pravilan trend porasta ili pada. Otežavajući faktor kod određivanja boje su kristalizirane čestice koje reflektiraju svjetlost. L^* vrijednosti kretale su se u rasponu od $26,35 \pm 0,79$ (0,075 M prekursor i ekstrakt) do $27,57 \pm 0,83$ (0,1 M prekursor i ekstrakt). Nanoprah sintetiziran iz 0,1 M prekursora i ekstrakta pokazao je najvišu L^* vrijednost, odnosno taj nanoprah je bio najsvjetlije boje. Smanjenjem koncentracije prekursora u reakcijskoj smjesi uočen je pad L^* vrijednosti, odnosno nanoprah je bio tamnije boje. Reakcijska smjesa 0,01 M prekursor i ekstrakt imala je L^* vrijednost $26,39 \pm 0,79$. Takva pojava je moguća uslijed sinteze različitih vrsta nanočestica željeza, koje su različitih boja, unutar različitih reakcijskih smjesa. Tako je Fe_3O_4 gotovo crne boje, Fe_2O_3 narančasto-crvene boje, FeOOH žute boje (Voss i sur., 2020). Vrijednosti parametra a^* kretale su se u rasponu od $-0,31 \pm 0,01$ (0,05 M prekursor i ekstrakt) do $0,53 \pm 0,02$ (0,1 M prekursor i ekstrakt). Samo je a^* vrijednost 0,1 M prekursora i ekstrakta bila pozitivna, dok su sve ostale reakcijske smjese poprimile negativnu vrijednost parametra a^* . Isto je opaženo i kod parametra b^* . Pozitivne vrijednosti parametra a^* upućuju na crvene tonove, dok negativne vrijednosti upućuju na zelene tonove (Ly i sur., 2020). Crveni tonovi upućuju na sintetizirane Fe_2O_3 čestice (Voss i sur., 2020). Vrijednosti parametra b^* kretale su se od $-1,05 \pm 0,03$ (0,075 M prekursor i ekstrakt) do $0,84 \pm 0,03$ (0,1 M prekursor i ekstrakt). Pozitivne vrijednosti parametra b^* upućuju na žute tonove, a negativne vrijednosti na plave tonove. Vrijednosti parametra Chroma kretale su se od $0,76 \pm 0,03$ (0,05 M prekursor i ekstrakt) do $1,08 \pm 0,03$ (0,075 M prekursor i ekstrakt). Vrijednosti parametra Chroma su niske zbog niskih a^* i b^* vrijednosti. Iz Tablice 3 je vidljivo kako su reakcijske smjese s prekursorom viših koncentracija pokazale veću zasićenost boje u odnosu na reakcijske smjese s prekursorima nižih koncentracija. Vrijednosti parametra hue kretale su se od $57,44 \pm 1,72$ (0,1 M prekursor i ekstrakt) do $267,09 \pm 8,01$ (0,01 M prekursor i ekstrakt). Vrijednosti parametra hue izrazito su visoke za reakcijske smjese u kojima su parametri a^* i b^* poprimili negativne vrijednosti (0,075 M prekursor i ekstrakt – 0,01 M prekursor i ekstrakt) pa se izmjerena boja nalazi u trećem kvadrantu. Posljedica toga je da je kut vrlo velik, odnosno hue vrijednost je vrlo visoka. Za razliku od toga, kod reakcijske smjese 0,1 M prekursora i ekstrakta, a^* i b^* vrijednosti nalaze se u prvom kvadrantu pa je i hue vrijednost znatno manja u odnosu na druge reakcijske smjese.

Tablica 3. Boja sintetiziranog nanopraha

	boja				
	L^*	a^*	b^*	Chroma	hue
0,1 M prekursor i ekstrakt	$27,57 \pm 0,83$	$0,53 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,03$	$57,44 \pm 1,72$
0,075 M prekursor i ekstrakt	$26,35 \pm 0,79$	$-0,24 \pm 0,01$	$-1,05 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,03$	$257,05 \pm 7,71$
0,05 M prekursor i ekstrakt	$26,78 \pm 0,80$	$-0,31 \pm 0,01$	$-0,70 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,03$	$246,04 \pm 7,38$
0,025 M prekursor i ekstrakt	$26,36 \pm 0,79$	$-0,26 \pm 0,01$	$-0,81 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,03$	$252,58 \pm 7,58$
0,01 M prekursor i ekstrakt	$26,39 \pm 0,79$	$-0,04 \pm 0,01$	$-0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$267,09 \pm 8,01$

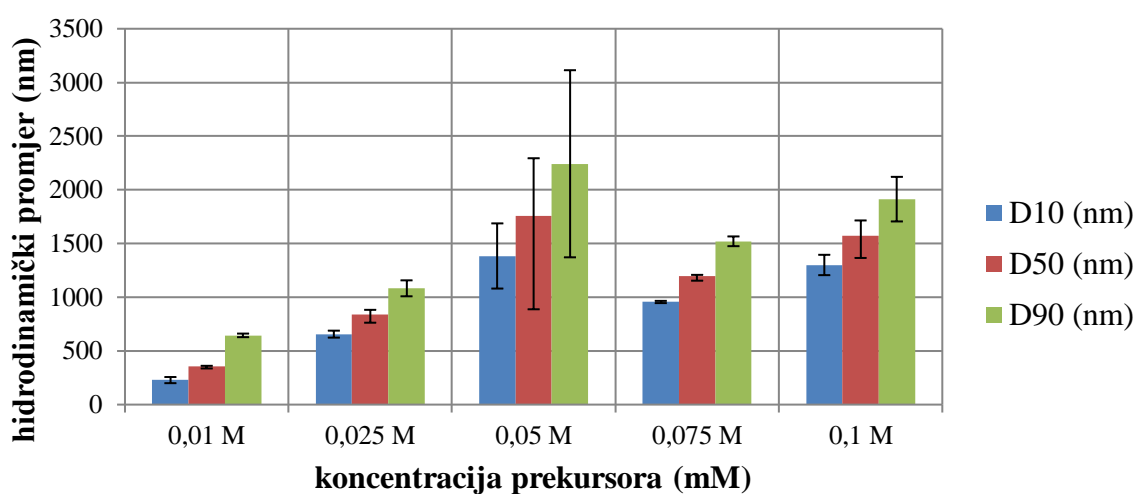
Tablica 4 sadrži mase sintetiziranih nanočestica željeza nakon izdvajanja supernatanta i sušenja taloga. Vidljivo je kako mase sintetiziranog nanopraha ne pokazuju pravilan pad od reakcijske smjese najveće (0,1 M prekursor i ekstrakt) do reakcijske smjese najmanje koncentracije (0,1 M prekursori ekstrakt). Reakcijska smjesa najveće koncentracije (0,1 M prekursor i ekstrakt) je pokazala najveću masu sintetiziranog nanopraha željeza ($0,1901 \pm 0,006$ g), što se objašnjava činjenicom da je u reakcijskoj smjesi napravljenoj od najviše otopine prekursora prisutno i najviše iona od kojih je moguće sintetizirati nanočestice. U reakcijskoj smjesi 0,01 M prekursora i ekstrakta sintetizirano je $0,1509 \pm 0,005$ g nanočestica. Nadalje, nepravilan trend pada masa nanočestica se objašnjava poteškoćama u odvajanju taloga od supernatanta iz reakcijske smjese te zbog mogućeg zaostatka određenog dijela nanočestica u samom supernatantu. Najmanja masa sintetiziranih nanočestica je u reakcijskoj smjesi 0,025 M prekursora i ekstrakta ($0,1389 \pm 0,004$ g).

Tablica 4. Mase sintetiziranog nanopraha

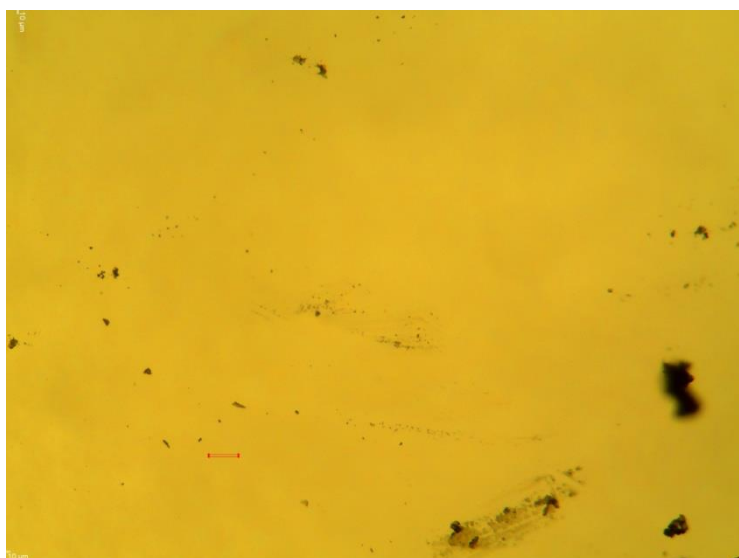
	masa sintetiziranog nanopraha (g)
0,1 M prekursor i ekstrakt	$0,1901 \pm 0,006$
0,075 M prekursor i ekstrakt	$0,1498 \pm 0,004$
0,05 M prekursor i ekstrakt	$0,1792 \pm 0,005$
0,025 M prekursor i ekstrakt	$0,1389 \pm 0,004$
0,01 M prekursor i ekstrakt	$0,1509 \pm 0,005$

Slika 6 prikazuje iznose hidrodinamičkih promjera sintetiziranih nanočestica u ovisnosti o koncentraciji prekursora, od 0,01 M prekursora do 0,1 M prekursora. Najmanji hidrodinamički promjer imaju sintetizirane čestice iz otopine prekursora najmanje, 0,01 M koncentracije. Kod te koncentracije je 10 % čestica ispod 228 nm, a 90 % čestica ispod 644 nm. Od postepenog povećavanja iznosa sintetiziranih nanočestica odstupa prekursor 0,05 M gdje je 10 % čestica ispod 1384 nm, a 90 % čestica ispod 2242 nm. Kod navedene koncentracije prekursora došlo je do sinteze najvećih čestica. Također, i u drugim

istraživanjima je navedeno kako utjecaj koncentracije prekursora na veličinu sintetiziranih čestica nije u potpunosti razjašnjen (Sharifi i sur., 2017). Većinom dolazi do povećanja nanočestica s povećanjem koncentracije prekursora uslijed rasta nukleusa i aglomeracije čestica (Lassoued i sur., 2017). Sharifi i suradnici (2017) smatraju da do smanjenja promjera čestica uslijed povećanja koncentracije prekursora, može doći uslijed nemogućnosti stabilizacije čestica. Posljedica toga je da nastajanje manje monomera koji se mogu aglomerirati i tvoriti veće nakupine (Sharifi i sur., 2017). Stvaranje većih nakupina čestica potvrđeno je i mikroskopskom slikom samog uzorka (slika 8).



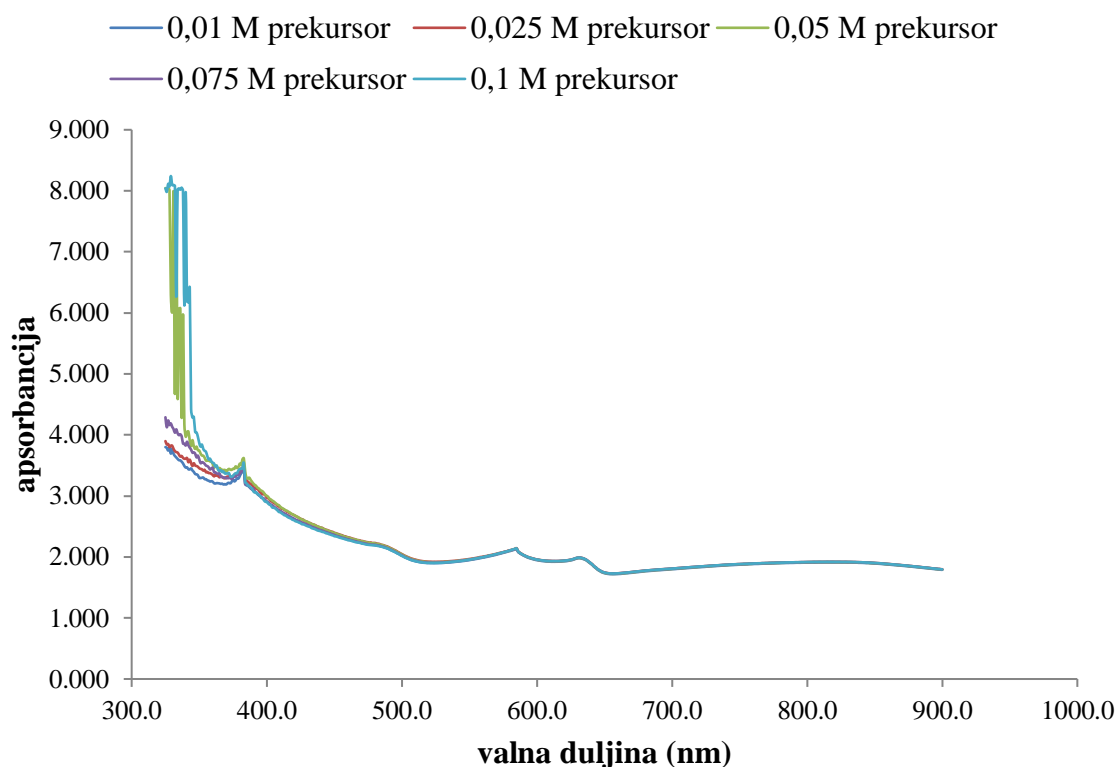
Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti hidrodinamičkog promjera o koncentraciji prekursora



Slika 7. Mikroskopska slika sintetiziranih nanočestica (0,1 M prekursor) (vlasita fotografija)

4.4. UV, NIR I FTIR SPEKTROSKOPIJA

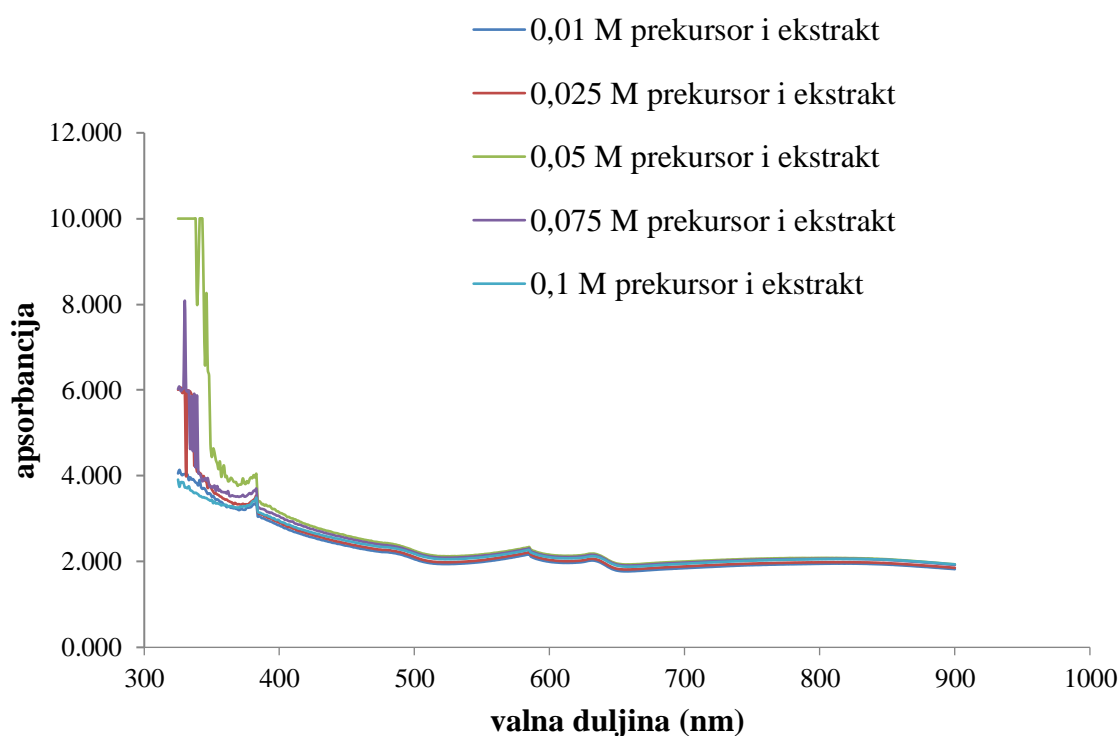
Prema Sethu i suradnicima (2022), očekivani pik karakterističan za FeCl_3 je na oko 300 nm^{-1} . Iz dobivenog grafa (Slika 8), koji je sniman od 300 do 900 nm^{-1} , vidljivo je kako svaka koncentracija prekursora ima uzlaznu liniju što bi odgovaralo literaturnim podacima. Također je prema linijama vidljivo da prekursor najmanje koncentracije ima najmanji apsorpcijski maksimum, a prekursora najveće koncentracije ima najveći apsorpcijski maksimum (Seth i sur., 2022).



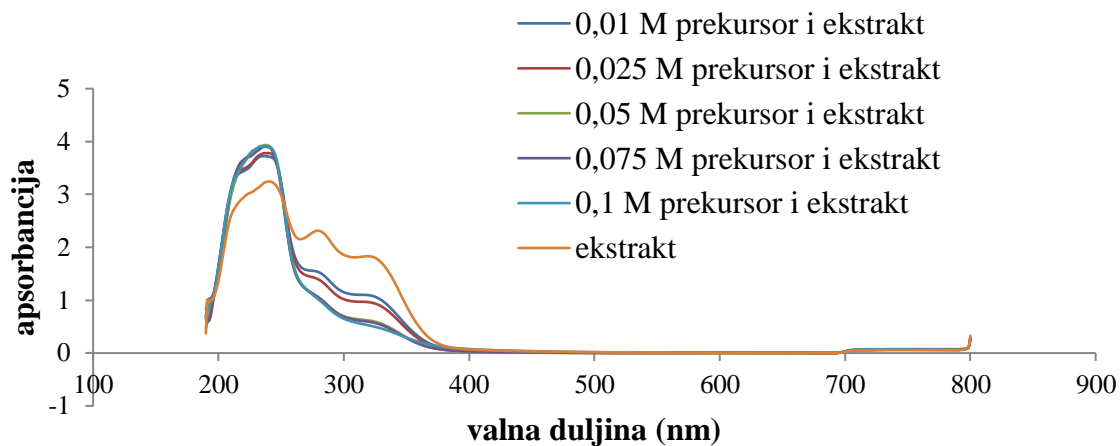
Slika 8. Grafički prikaz UV spektra otopina prekursora

Slika 9 prikazuje UV spektar sintetiziranih nanočestica snimanih u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm^{-1} , dok je na slici 10 je prikazan UV spektar koji je sniman u rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm^{-1} . Navedenim otopinama snimani su UV spektri na dva uređaja, kako bi se mogle obuhvatiti valne duljine ispod 300 nm ($200 - 300 \text{ nm}$), na kojima su, prema literaturnim podacima, vidljive nanočestice željeza nastale biokatalitičkom sintezom. Pik vidljiv na Slici 10, koji se nalazi na valnoj duljini od 245 nm ukazuje na prisustvo Fe^{3+} čestica (Loures i sur., 2013). Drugi pik sa Slike 10, nalazi se na valnoj duljini od 289 nm , a odnosi se na nastale Fe_3O_4 nanočestice (Niraimathee i sur., 2016). Pri 315 nm javlja se još jedan pik koji se odnosi na pretvorbu FeCl_3 u druge oblike nanočestica željeza (Saif i sur., 2019).

Prikazanim UV spektrima potvrđen je nastanak nanočestica željeza u reakcijskim smjesama pripremljenim u ovom radu. Nadalje, u prikazu UV spektara na Slici 10, vidljiv je pika pri valnoj duljini 340 – 350 nm, koji je najviši kod otopine čistog ekstrakta, a s dodatkom otopine prekursora navedeni se pik smanjuje ili u potpunosti nestaje kako se povećava koncentracija otopine prekursora. Navedeni pik karakterističan je za flavonoide, koji djeluju kao fitoreducensi u reakcijama sinteze nanočestica (Taniguchi i sur., 2023; Marslin i sur., 2018;). Kod otopina prekursora nižih koncentracija vidljivo je da nisu utrošeni svi flavonoidi na sintezu (pik je još uvijek prisutan), dok je kod najviše koncentracije otopine prekursora pik u potpunosti nestao, što sugerira da su svi flavonoidi iskorišteni za sintezu nanočestica.

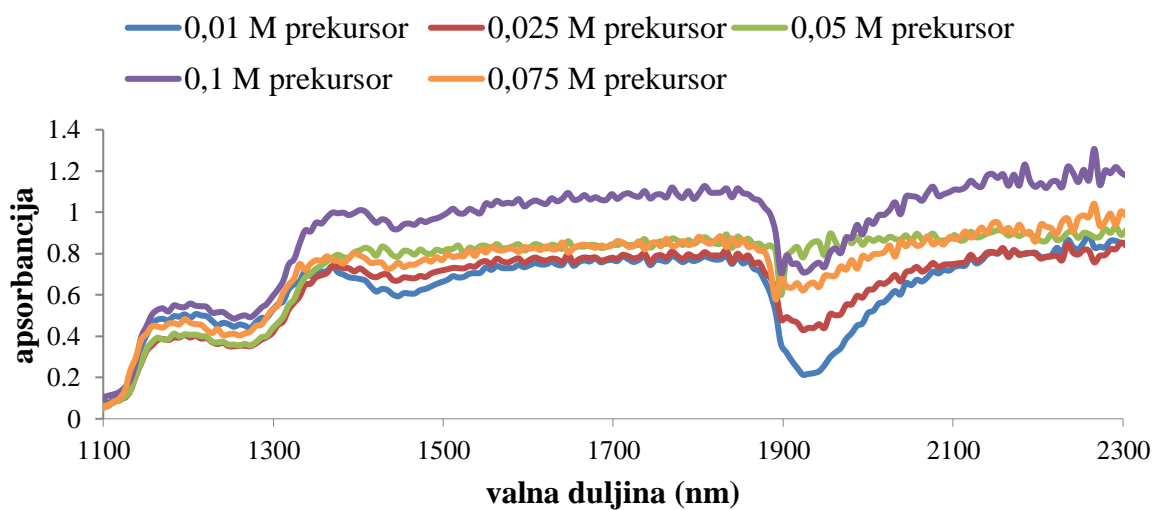


Slika 9. Grafički prikaz UV spektra reakcijskih smjesa



Slika 10. Grafički prikaz UV spektra reakcijskih smjesa

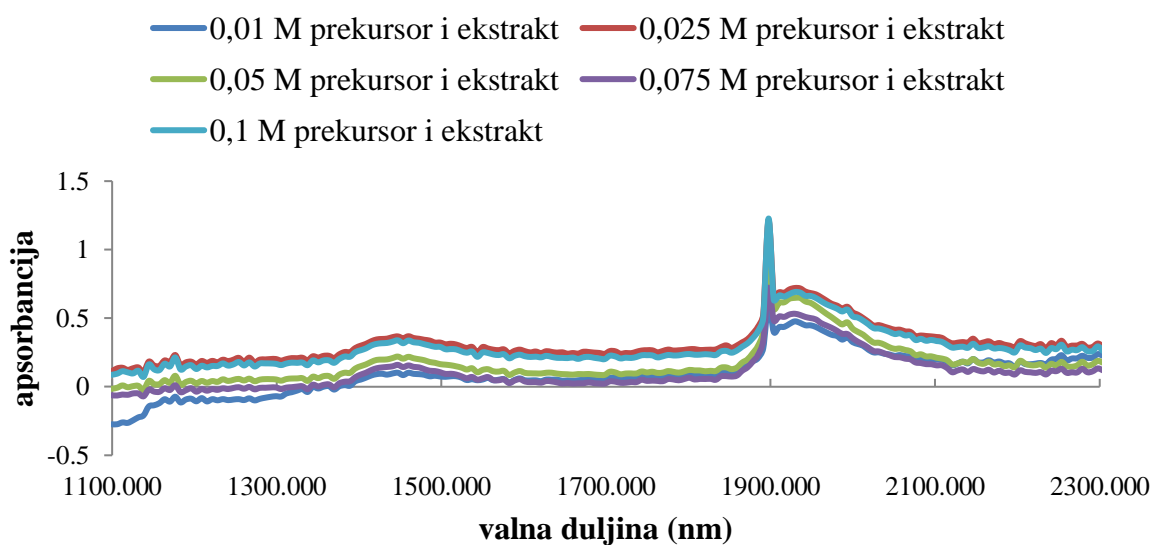
Na Slici 11 prikazan je NIR spektar otopina prekursora, spektar je sniman u rasponu valnih duljina od 1000 do 2500 nm. Vidljivi pikovi na valnim duljinama od 1400 nm i 1950 nm karakteristični su za vibracije unutar molekule vode. Pik na 1400 nm odnosi se na O-H vezu, dok je pik na 1950 karakterističan za molekulu vode i predstavlja H-O-H, odnosno O-H vezu (AzoM, 2023). Karakterističnih pikova za FeCl_3 nema u NIR području (Baba, 2019). Iz Slike 11 je vidljivo kako prekursor najmanje koncentracije (0,01 M) ima najmanju apsorbanciju, a prekursor najveće koncentracije (0,1 M) ima najveću apsorbanciju na istim pikovima. Kod pika na 1900 nm vidljivo je da je 0,05 M prekursor imao veću apsorbanciju od 0,075 M prekursora.



Slika 11. Grafički prikaz NIR spektra otopina prekursora

Slika 12 prikazuje NIR spektar reakcijskih smjesa otopina prekursora i ekstrakta. Pik vidljiv oko 1450 nm pripisuje se O-H vezi (AzoM, 2023). Magnetit, čija je formula Fe_3O_4 može se identificirati u NIR području oko valne duljine iznosa 1500 nm. Prilikom formiranja magnetita, ioni željeza u Fe^{2+} obliku oksidiraju u Fe^{3+} (Scheinost i sur., 1998). Hematit, odnosno $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Pri valnoj duljini oko 1900 nm vidljiv je pik koji je karakterističan za vodu, odnosno O-H vezu (AzoM, 2023). Iz Slike 12 je vidljivo kako reakcijska smjesa najniže koncentracije (0,01 M prekursor i ekstrakt) ima najmanju apsorbanciju. Reakcijska smjesa 0,1 M prekursora i ekstrakta se podudara s reakcijskom smjesom 0,025 M prekursora i ekstrakta te imaju gotovo jednake vrijednosti apsorbancije. Pri valnoj duljini od 1900 nm vidljiv je šum koji se javljao pri svakom mjerenju.

Pik vidljiv na Slici 11, koji se nalazi na 1200 nm karakterističan je za pik otopine HCl-a (Chang i sur., 2018). U otopinama prekursora dolazi do reakcije između FeCl_3 i H_2O , jedan od produkata je upravo HCl. To se može potvrditi niskim pH otopina prekursora u Tablici 1. Taj pik više nije vidljiv na Slici 12 gdje su prikazani spektri reakcijskih smjesa jer je u njima znatno manja koncentracija prekursora. To je vidljivo i iz pH otopina reakcijskih smjesa u Tablici 2 gdje je pH viši u odnosu na pH prekursora.



Slika 12. Grafički prikaz NIR spektra reakcijskih smjesa otopina prekursora i ekstrakta

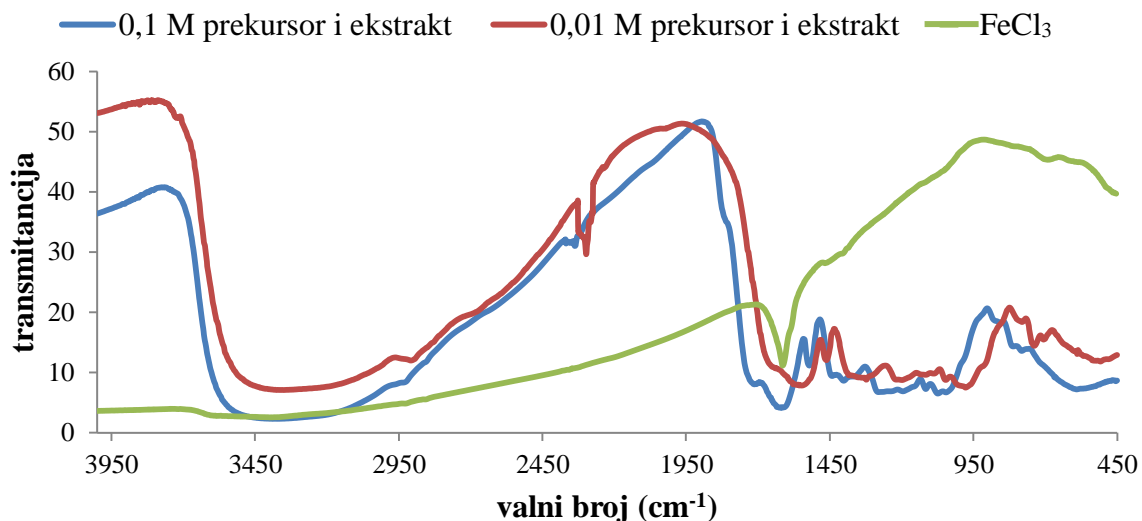
Na Slici 13 prikazani su FTIR spektri soli prekursora ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sintetiziranih nanočestica pomoću otopina ekstrakta i 0,1 M prekursora, te sintetiziranih nanočestica pomoću ekstrakta i 0,01 M otopine prekursora.

Karakteristični pikovi za sol prekursora, odnosno $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ zabilježeni su na 1615 cm^{-1} i

755 cm^{-1} . Pik vidljiv na 1600 cm^{-1} se odnosi na kristalnu vodu koja je prisutna u kristalima određenih soli. Pik na 755 cm^{-1} karakterističan je za Fe-O vezu (Inam i sur., 2018).

Analizom sintetiziranih nanočestica željeza iz ekstrakta i 0,01 M prekursora uočene su apsorpcijske vrste pri 3375 cm^{-1} , 2905 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} , 1010 cm^{-1} i 520 cm^{-1} . Široka vrpca na 3375 cm^{-1} karakteristična je za OH grupu (Lin i sur., 2017). Pik na 2905 cm^{-1} , kao i pik na 1460 cm^{-1} karakteristični su za vibracije unutar CH_2 grupe (Niraimathee i sur., 2016). Za C=O skupinu u aldehydima i C=C skupinu u aromatskim spojevima karakterističan je pik pri 1560 cm^{-1} (Saif i sur., 2019). Amidi, odnosno C-N veza, identificirana je na 1320 cm^{-1} (Saif i sur., 2019). Pik na 1200 cm^{-1} karakterističan je za C-H i C-O veze prisutne kod alkohola, estera, etera i karboksilnih kiselina (Bouafia i sur., 2021). Za C-O vezu karakterističan je i pik na 1010 cm^{-1} (Saif i sur., 2019). Apsorpcijskom vrpcom na 520 cm^{-1} okarakterizirana je Fe-O vezu (Alangari i sur., 2022). Pik na 660 cm^{-1} odnosi se na FeOOH, dok je pik na 530 cm^{-1} karakterističan za Fe_2O_3 (Lin i sur., 2017).

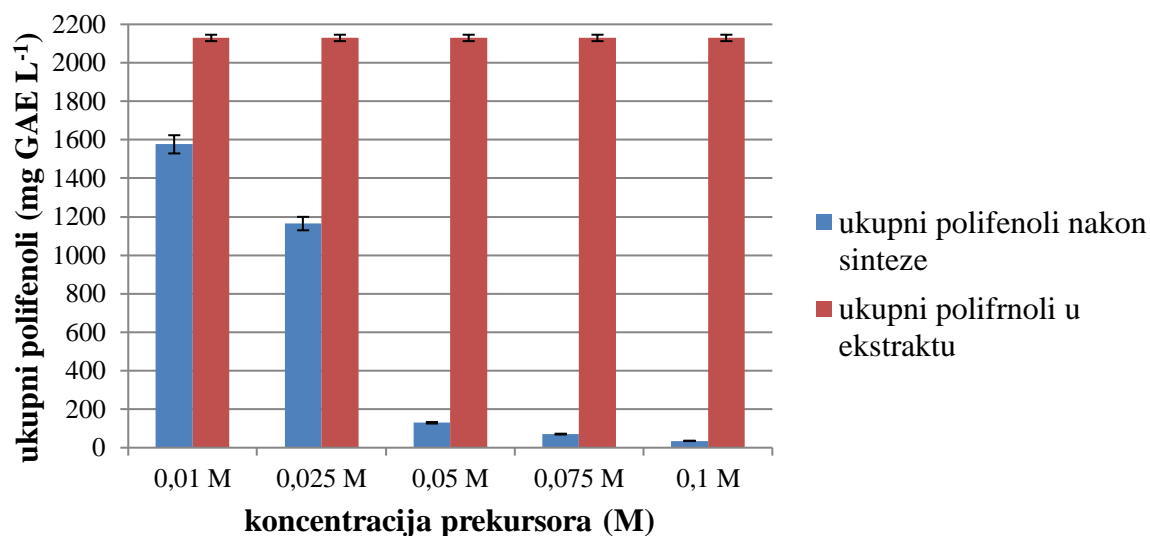
Pikovi nanočestica sintetiziranih iz ekstrakta i 0,1 M prekursora vidljivi su pri 3350 cm^{-1} , 2905 cm^{-1} , 2290 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 960 cm^{-1} , 700 cm^{-1} i 550 cm^{-1} . Široka vrpca vidljiva na 3350 cm^{-1} karakteristična je za rastezne vibracije O-H veze (Niraimathee i sur., 2016). OH grupa karakteristična je za fenolne tvari i alkohole (Seth i sur., 2022). Za vibracije unutar CH_2 grupe karakterističan je pik na 2905 cm^{-1} . Pik na 2290 cm^{-1} karakterističan je aromatske i alifatske spojeve s $\text{C}\equiv\text{C}$ i $\text{C}\equiv\text{N}$ vezom koji potječu iz ekstrakta (Piretarighat i sur., 2017). Taj pik nije vid u reakcijskoj smjesi 0,1 M prekursora i ekstrakta uslijed trošenja navedenih komponenti prilikom biosinteze. Pik vidljiv pri 1660 cm^{-1} karakterističan je za C=O vezu u aldehydima, dok je pik na 1550 cm^{-1} karakterističan za C=C skupinu (Saif i sur., 2019). Pik na 1450 cm^{-1} karakterističan je za CH_2 grupu (Niraimathee i sur., 2016). Na 1350 cm^{-1} uočen je pik karakterističan za amide, odnosno C-N vezu (Saif i sur., 2019). Pik vidljiv na 1200 cm^{-1} odnosi se na C-H i C-O veze (Bouafia i sur., 2021). Za C-O vezu karakterističan je i pik na 1050 cm^{-1} (Saif i sur., 2019). Pik alkanske skupine se može uočiti na 960 cm^{-1} (Saif i sur., 2019). Aromatske cikličke monoterpene karakterizira pik na 700 cm^{-1} (Piretarighat i sur., 2017). Pik vidljiv na 550 cm^{-1} karakterističan je za Fe_2O_3 (Lin i sur., 2017). Spektri 0,1 M prekursora i ekstrakta te 0,01 M prekursora i ekstrakta poklapaju se na većini područja. Na područjima gdje nisu prisutni isti pikovi moglo je doći do trošenja komponenti uslijed biosinteze nanočestica željeza.



Slika 13. Grafički prikaz FTIR spektara soli prekursora, reakcijske smjese ekstrakta i 0,1 M prekursora te ekstrakta i 0,01 M prekursora

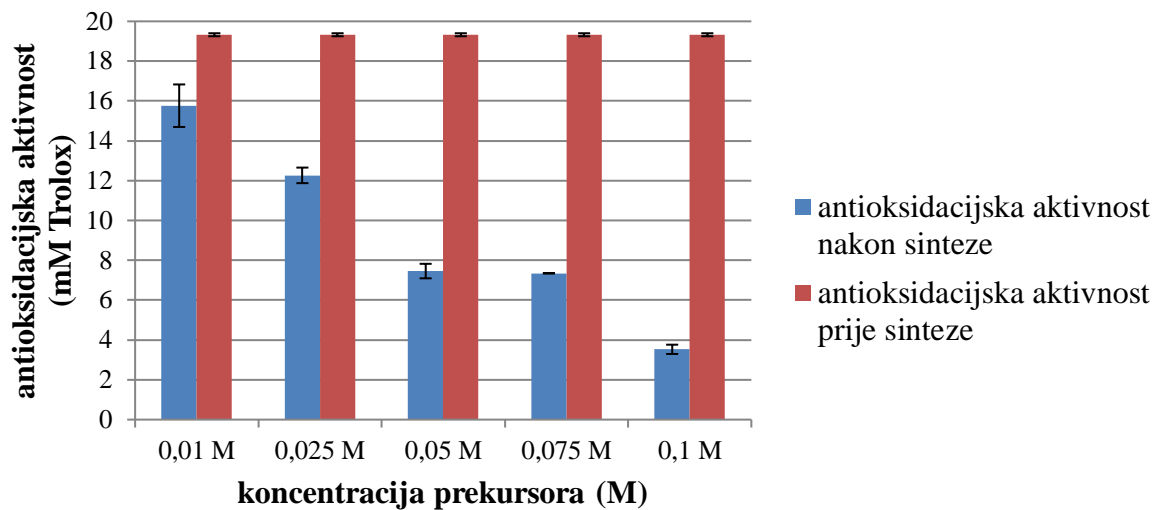
4.5. UKUPNI POLIFENOLI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Nakon provedene sinteze, iz supernatanata su izdvojeni uzorci za provedbu mjerenja ukupnih polifenola. Najviše polifenola je u ekstraktu melise, a upravo su se ti polifenoli trošili za sintezu nanočestica željeza. Količina ukupnih polifenola u ekstraktu melise od 2129 ± 16 mg GAE L⁻¹ (Slika 13) podudara se s literaturnim podacima gdje je dobiveno 1824 mg GAE L⁻¹ (Ziagova i sur., 2022). Količina polifenola ovisi o parametrima tijekom izdvajanja ekstrakta i o samoj biljci. Najmanje polifenola je utrošeno za sintezu nanočestica željeza s 0,01 M prekursorom, utrošeno je 552 mg GAE L⁻¹. S povećanjem koncentracije prekursora vidljivo je da je sve više ukupnih polifenola utrošenih za sintezu. Za sintezu nanočestica pomoću 0,1 M prekursora utrošeni su gotovo svi polifenoli (2094 mg GAE L⁻¹), upravo je tim uzorkom dobivena najveća masa nanočestica ($0,1901 \pm 0,006$ g). S druge strane, u reakcijskoj smjesi 0,01 M prekursora i ekstrakta utrošeno je najmanje polifenola, je 552 mg GAE L⁻¹, a masa nanopraha je iznosila $0,1509 \pm 0,005$ g, dok je za najmanju masu sintetiziranih čestica ($0,1389 \pm 0,004$) utrošeno 964 mg GAE L⁻¹ (0,025 M prekursor i ekstrakt). Trend povećanja količine utrošenih polifenola za sintezu ne slaže se u potpunosti s masama sintetiziranog nanopraha jer je uslijed izdvajanja supernatanta moglo doći do odvajanja taloga pa je samim time i masa čestica bila manja. Iz dobivenog je vidljivo kako koncentracija prekursora utječe na potrošnju polifenola u sintezi jer iz prekursora potječu ioni željeza koji su nužni u sintezi nanočestica željeza (Bouafia i sur., 2020).



Slika 14. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktu i nakon provedene sinteze

Polifenoli su primarni antioksidansi pa se količina polifenola u ekstraktu prije i nakon sinteze poklapa s antioksidacijskim kapacitetom. Antioksidansi (polifenoli) predaju vodik slobodnom radikalu \cdot DPPH kako bi ga reducirali. Na Slici 14 prikazan je graf antioksidacijskog kapaciteta na kojem je vidljivo kako ekstrakt ima najveću antioksidacijsku aktivnost ($19,33 \pm 0,08$ mM Trolox). Povećanjem koncentracije prekursora (od 0,01 M do 0,1 M) dolazi do intenzivnije sinteze nanočestica pa je sve manje dostupnih antioksidanasa koji bi mogli reducirati \cdot DPPH. Prilikom sinteze nanočestica u reakcijskoj smjesi 0,01 prekursora i ekstrakta, antioksidacijska aktivnost se smanjila za $3,56 \pm 1,07$ mM Trolox, dok je u reakcijskoj smjesi 0,1 prekursora i ekstrakta antioksidacijska aktivnost smanjena za $15,80 \pm 0,23$ mM Trolox. Iz Slike 14 je vidljivo kako je s povećanjem koncentracije prekursora u reakcijskoj smjesi (0,01 M – 0,1 M) došlo do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Neki od antioksidanasa koji su prisutni u vodenom ekstraktu melise, a samim time se i troše tijekom biosinteze su hidroksicimetna kiselina, ružmarinska i kava kiselina te flavonoidi (Miraj i sur., 2017).



Slika 15. Grafički prikaz antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktu i nakon provedene sinteze

5. ZAKLJUČCI

1. Vrijednosti električne vodljivosti otopina prekursora, kao i reakcijskih smjesa, povećavaju se od prekursora najmanje koncentracije (0,01 M) do prekursora najveće koncentracije (0,1 M). pH vrijednosti otopina prekursora i reakcijskih smjesa smanjuju se od prekursora najmanje koncentracije (0,01 M) do prekursora najveće koncentracije (0,1 M).
2. Dodatkom ekstrakta u otopinu prekursora došlo je do promjene boje iz žute u tamno zelenu boju. Promjena boje indikator je provedene biosinteze nanočestica željeza.
3. Iz masa sintetiziranih nanočestica vidljivo je kako je iz reakcijske smjese ekstrakta i prekursora najveće koncentracije (0,1 M) nastalo najviše nanočestica željeza – $0,1901 \pm 0,006$ g.
4. Podaci o količini ukupnih polifenola u ekstraktu i reakcijskim smjesama pokazuju trend porasta utrošenih polifenola od reakcijske smjese najmanje koncentracije (0,01 M) do reakcijske smjese najveće koncentracije (0,1 M). Isti se trend pokazao i prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta.
5. Karakteristični pikovi za sintetizirane nanočestice željeza identificirani su primjenom UV, NIR i FTIR spektroskopije.

6. LITERATURA

Alangari A, Alqahtani MS, Mateen A, Kalam MA, Alshememry A, Ali R, i sur. (2022) Iron Oxide Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Assessment of Antimicrobial and Anticancer Activity. *Adsorption Science and Technology*, **2022**. <https://doi.org/10.1155/2022/1562051>

An Introduction to Online NIR Water Measurements in Liquid Samples (2023) AZoM. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=17511>. Pristupljeno 4. lipnja 2023.

Arakha M, Pal S, Samantarrai D, Panigrahi TK, Mallick BC, Pramanik K, i sur. (2015) Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle - bacteria interface. *Scientific Reports*, **5**. <https://doi.org/10.1038/srep14813>

Attia NF, El-Monaem EMA, El-Aqapa HG, Elashery SEA, Eltaweil AS, El Kady M, i sur. (2022) Iron oxide nanoparticles and their pharmaceutical applications. *Applied Surface Science Advances*, **11**. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100284>

Baba K, Bengasi G, El Assad D, Grysan P, Lentzen E, Heinze K, i sur. (2019) Conductive Directly Fused Poly (Porphyrin) Coatings by Oxidative Chemical Vapour Deposition – From Single - to Triple - Fused. *European Journal of Organic Chemistry*, 2368–2375. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900045>

Baumler SM, Hartt WH, Allen HC (2019) Hydration of ferric chloride and nitrate in aqueous solutions: Water-mediated ion pairing revealed by Raman spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **21(35)**, 19172–19180. <https://doi.org/10.1039/c9cp01392j>

Benković M, Valinger D, Jurina T, Gajdoš Kljusurić J, Jurinjak Tušek A (2023) Biocatalysis as a Green Approach for Synthesis of Iron Nanoparticles—Batch and Microflow Process Comparison. *Catalysts*, **13(1)**. <https://doi.org/10.3390/catal13010112>

Bouafia A, Laouini SE, Khelef A, Tedjani ML, Guemari F (2021) Effect of Ferric Chloride Concentration on the Type of Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles Biosynthesized by Aqueous Leaves Extract of *Artemisia* and Assessment of Their Antioxidant Activities. *Journal of Cluster Science*, **32(4)**, 1033–1041. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01868-7>

Cao M, Li Z, Wang J, Ge W, Yue T, Li R, i sur. (2012) Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science and Technology*, **27(1)**, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.003>

Chang K, Shinzawa H, Chung H (2018) Concentration determination of inorganic acids that do not absorb near-infrared (NIR) radiation through recognizing perturbed NIR water bands by them and investigation of accuracy dependency on their acidities. *Microchemical Journal*, **139**, 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.019>

Ebrahiminezhad A, Zare-Hoseinabadi A, Sarmah AK, Taghizadeh S, Ghasemi Y, Berenjian A (2018) Plant – Mediated Synthesis and Applications of Iron Nanoparticles. *Molecular Biotechnology*, **60(2)**, 154–168. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0053-4>

Hussain I, Singh NB, Singh A, Singh H, Singh SC (2016) Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, **38(4)**, 545–560. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>

Huston M, DeBella M, DiBella M, Gupta A (2021) Green synthesis of nanomaterials: An overview. *Materials Today: Proceedings*, **47**, 907–913. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.564>

Inam MA, Khan R, Park DR, Lee YW, Yeom IT (2018) Removal of Sb(III) and Sb(V) by ferric chloride coagulation: Implications of Fe solubility. *Water (Switzerland)*, **10(4)**. <https://doi.org/10.3390/w10040418>

Jadoun S, Arif R, Jangid NK, Meena RK (2021) Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **19(1)**, 355–374. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>

KSV G, Reddy PH, Zamare D (2017) Green Synthesis of Iron Nanoparticles Using Green Tea leaves Extract. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery*, **07(01)**, 1–4. <https://doi.org/10.4172/2155-983x.1000151>

Lassoued A, Dkhil B, Gadri A, Ammar S (2017) Control of the shape and size of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles synthesized through the chemical precipitation method. *Results in Physics*, **7**, 3007–3015. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.07.066>

Lin Y, Wu B, Ning P, Qu G, Li J, Wang X, i sur. (2017) Stabilization of arsenic in waste slag using FeCl₂ or FeCl₃ stabilizer. *RSC Advances*, **7(87)**, 54956–54963. <https://doi.org/10.1039/c7ra10169d>

Loures CC, Alcantara MA, Filho HJ, Teixeira AC, Silva FT, Paiva TC, i sur. (2013) Advanced Oxidative Degradation Processes. *International Review of Chemical Engineering*, **5(2)**, 102–120. <https://doi.org/10.15866/ireche.v5i2.6909>

Ly BCK, Dyer EB, Feig JL, Chien AL, Del Bino S (2020) Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *Journal of Investigative Dermatology*, **140(1)**, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.003>

Mahanty S, Bakshi M, Ghosh S, Chatterjee S, Bhattacharyya S, Das P, i sur. (2019) Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Mediated by Filamentous Fungi Isolated from Sundarban Mangrove Ecosystem, India. *BioNanoScience*, **9(3)**, 637–651. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00644-w>

Mahanty S, Ghosh S, Gaine T, Chatterjee S, Bhattacharyya S, Das S, i sur. (2019) Mycosynthesis of iron oxide nanoparticles using manglicolous fungi isolated from Indian sundarbans and its application for the treatment of chromium containing solution: Synthesis, adsorption isotherm, kinetics and thermodynamics study. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, **12(2)**. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2019.10027>

Marslin G, Siram K, Maqbool Q, Selvakesavan RK, Kruszka D, Kachlicki P, i sur. (2018) Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. *Materials*, **11(6)**. <https://doi.org/10.3390/ma11060940>

Miraj S, Rafieian-Kopaei M, Kiani S (2017) Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **22(3)**, 385–394. <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>

Niraimathee VA, Subha V, Ernest Ravindran RS, Renganathan S (2016) Green synthesis of iron nanoparticles from Mimosa pudica root extract. *International Journal of Environment and Sustainable Development*, **15(3)**, 227–240. <https://doi.org/10.1504/IJESD.2016.077370>

Saif S, Tahir A, Asim T, Chen Y, Adil SF (2019) Polymeric Nanocomposites of Iron-Oxide

Nanoparticles (IONPs) Synthesized Using Terminalia Chebula Leaf Extract for Enhanced Adsorption of Arsenic(V) from Water. *Colloids and Interfaces*, **3(1)**. <https://doi.org/10.3390/coloids3010017>

Scheinost, AC, Chavernas A, Barrón V, Torrent J (1998) Use and limitations of second – derivative diffuse reflectance spectroscopy in the visible to near-infrared range to identify and quantify Fe oxide minerals in soils. *Claysand Clay Minerals*, **46(5)**, 528–536. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1998.0460506>

Seth A, Devi E, Thakur K, Attri C, Singh V, Bhandari S, i sur. (2022) Himalayan Fern Cheilanthes bicolor Mediated Fabrication and Characterization of Iron Nanoparticles with Antimicrobial Potential. *BioNanoScience*, **12(2)**, 486–495. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00969-z>

Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B (2016) Melissa officinalis L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, **188**, 204–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>

Sharifi DH., Halda RA., Ersöz B, Tremel W, Jakob G, Asadi K (2017) Effect of precursor concentration on size evolution of iron oxide nanoparticles. *CrystEngComm*, **19(44)**, 6694–6702. <https://doi.org/10.1039/c7ce01406f>

Spanos A, Athanasiou K, Ioannou A, Fotopoulos V, Krasia-Christoforou T (2021) Functionalized magnetic nanomaterials in agricultural applications. *Nanomaterials*, **11(11)**. <https://doi.org/10.3390/nano11113106>

Taniguchi M, LaRocca CA, Bernat JD, Lindsey JS (2023) Digital Database of Absorption Spectra of Diverse Flavonoids Enables Structural Comparisons and Quantitative Evaluations. *Journal of Natural Products*, **86(4)**, 1087–1119. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00720>

Voss L, Hsiao I, Ebisch M, Vidmar J, Drejack N, Böhmert L, i sur. (2020) The presence of iron oxide nanoparticles in the food pigment E172. *Food chemistry*, **327**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127000>

Yadav KC, Yadav B (2020). Measurement of Conductance of FeCl₃ in Distilled Water at Different Temperature and Concentration. *Rupantaran: A Multidisciplinary Journal*, **3**, 10–16. <https://doi.org/10.3126/rupantaran.v3i0.31735>

Ziagova MG, Mavromatidou C, Samiotis G, Amanatidou E (2022) Enhancing phenolic content of medicinal aromatic plants extracts – bio functional foods preparation. *Plants*, **11(1)**. <https://doi.org/10.3390/plants11010076>

Izjava o izvornosti

Ja Marta Majetić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marta Majetić
Vlastoručni potpis