

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
Kemijски odsjek

Kemijски seminar I
Kristian Nakić

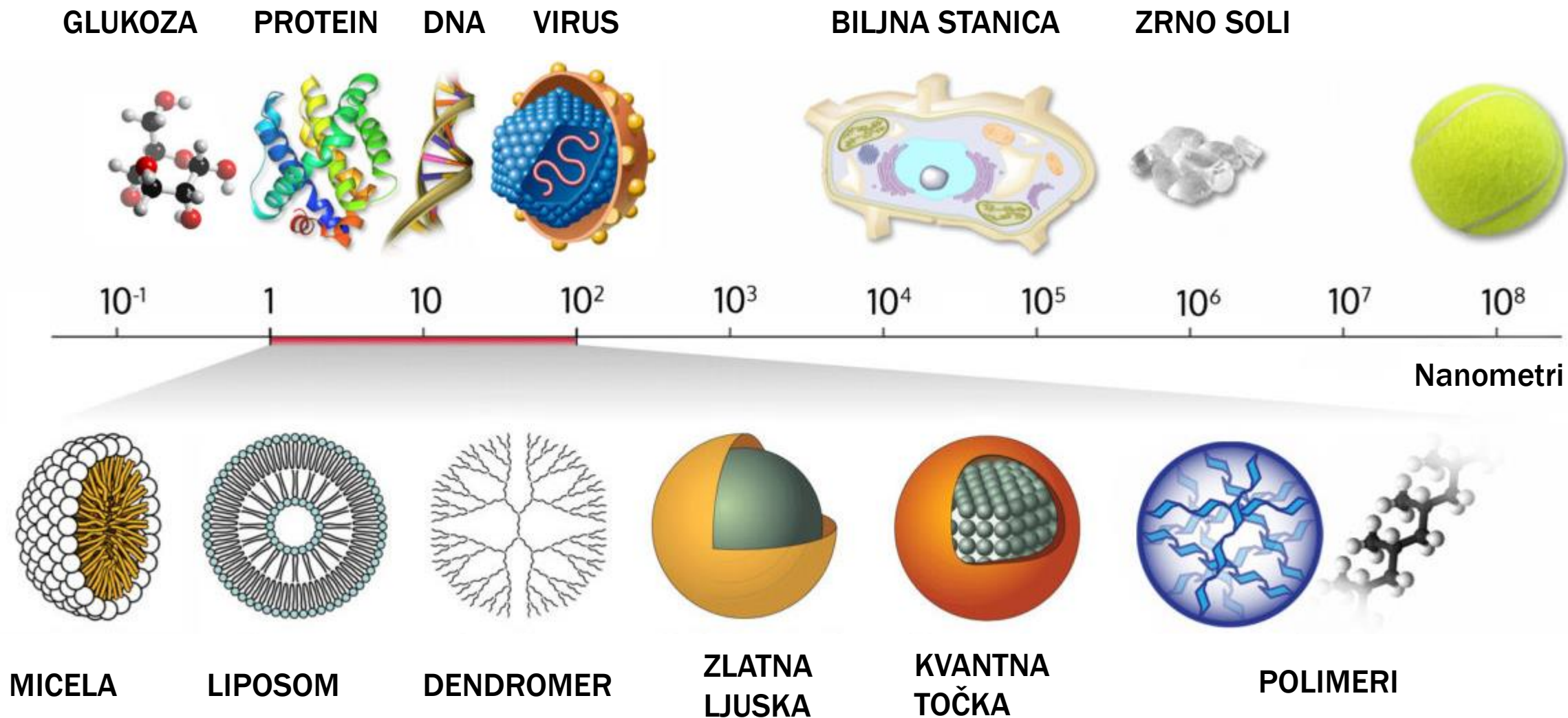
**Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida korištenjem ekstrakta morske lavande
(*Limonium pruinosum* L. Chaz.): karakterizacija te procjena antitumorskog,
antimikrobnog i antioksidacijskog potencijala**

Izrađeno prema radu:

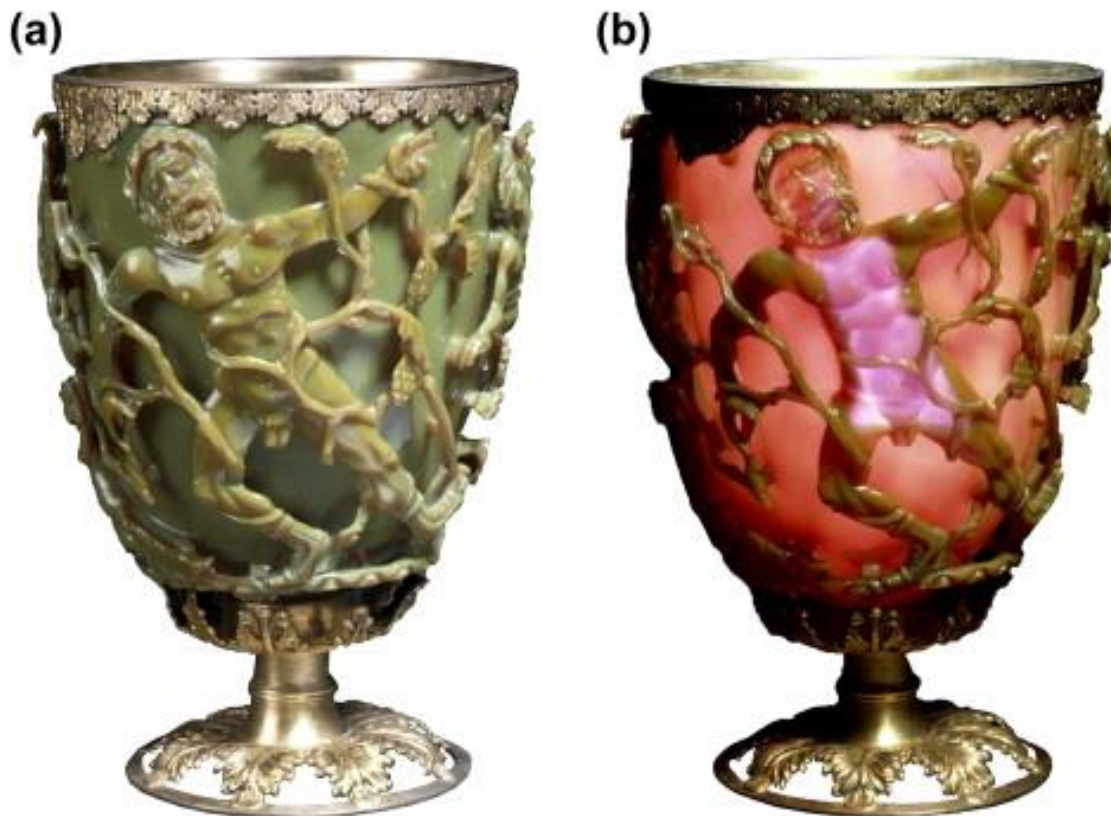
B. Naiel, M. Fawzy, M. W. A. Halmy, A. E. D. Mahmoud, *Sci. Rep.* **12 (2022) 1–12.**

Zagreb,
ožujak 2024.

Nanočestice – definicija i podjela



Najranije zabilježena upotreba nanočestica (1)

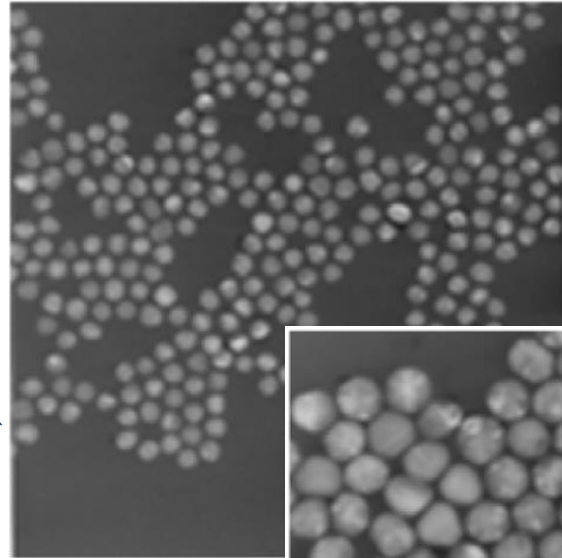


Likurgov pehar (4. st.) promatran u refleksiji (a) i transmisiji svjetlosti (b).

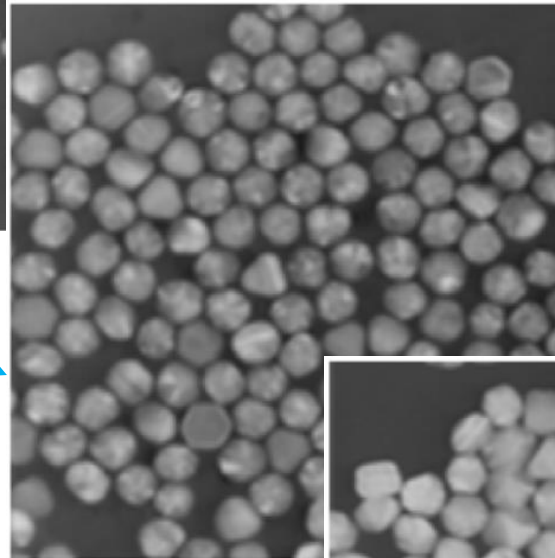
Najranije zabilježena upotreba nanočestica (2)



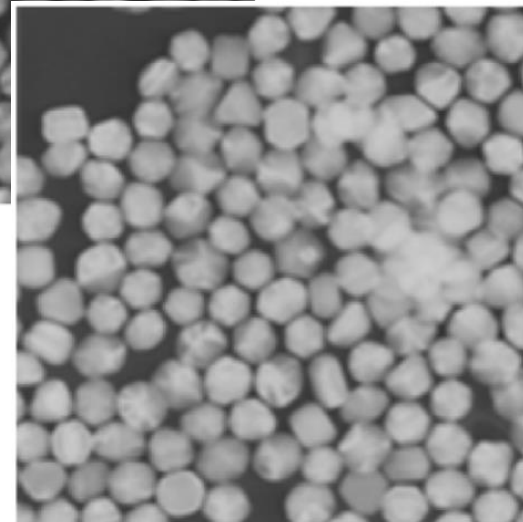
Vitraj.



Srebro – sfere
veličina čestica: **40 nm**
Reflektirana boja: **modra**

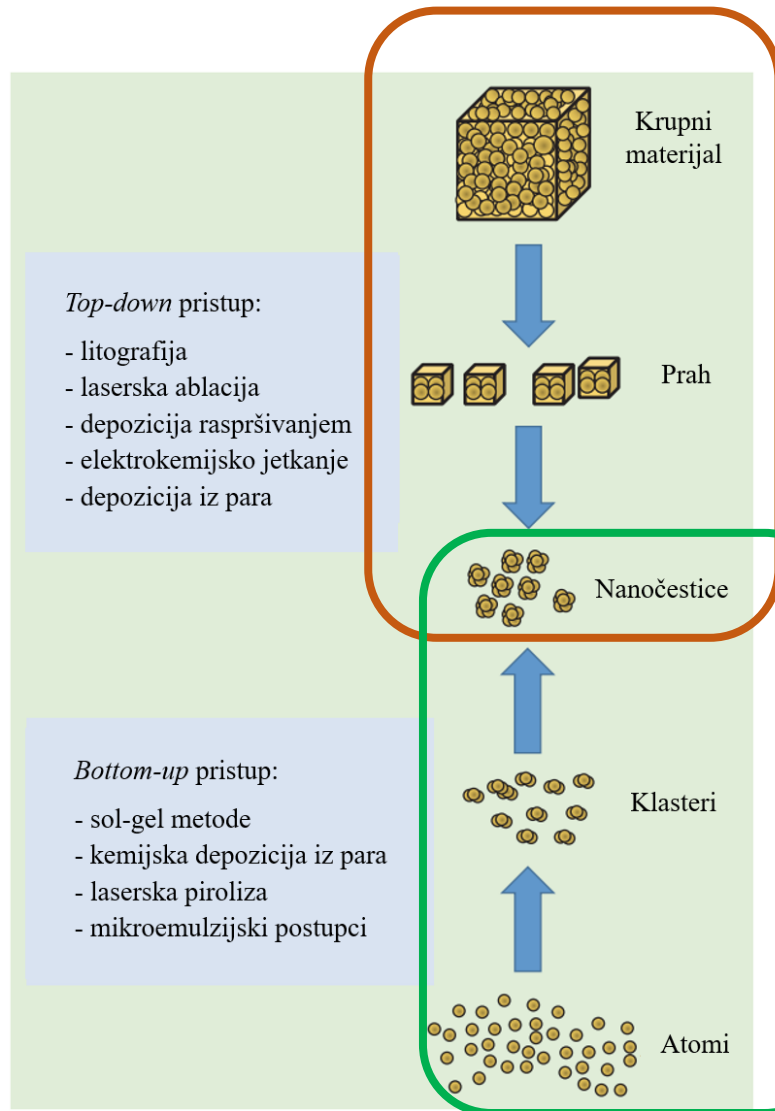


Srebro – sfere
veličina čestica: **80 nm**
Reflektirana boja: **nebeskoplava**



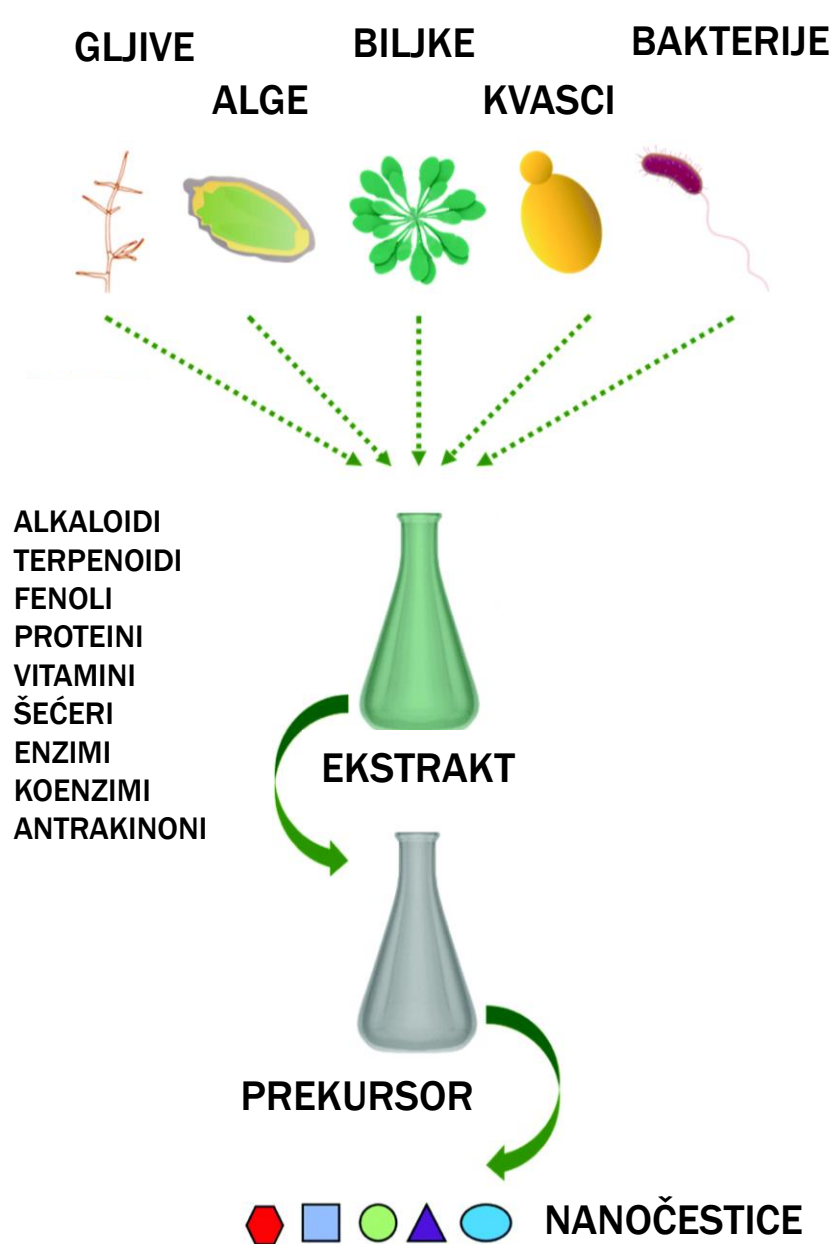
Srebro – sfere
veličina čestica: **100 nm**
Reflektirana boja: **zlačana**

Dobivanje nanočestica



✓ nanočestice
metalnih oksida

Zelena sinteza nanočestica metalnih oksida



OBRADA BIOLOŠKOG
MATERIJALA



EKSTRAKCIJA

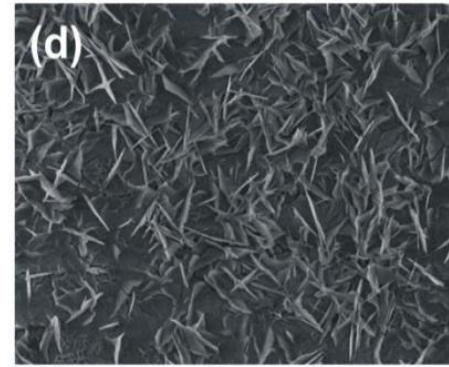
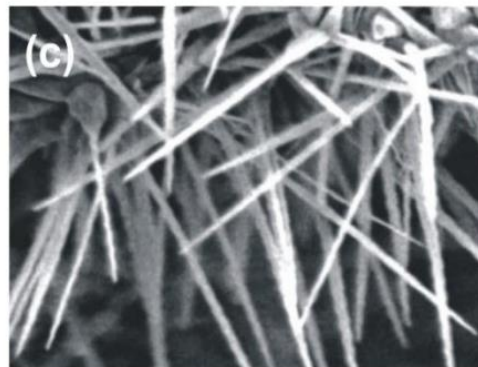
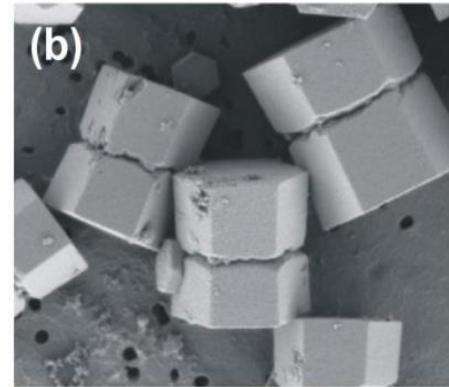
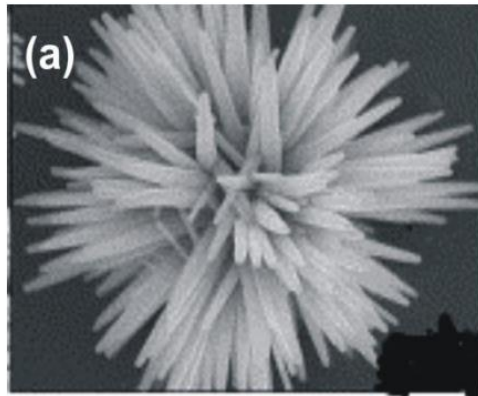


ZELENA SINTEZA



Zelena sinteza nanočestice cinkova oksida upotrebom morske lavande (*Limonium pruinosum*)

- Uvod u nanočestice cinkova oksida



Primjeri nanostruktura cinkova oksida:

- a) nanocvjetić,
- b) nanoštapići,
- c) i d) nanožice.

Mikrografije su snimljene pretražnim elektronskim mikroskopom s emisijom polja elektrona (FE-SEM).

Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida upotrebom morske lavande (*Limonium pruinosum*)

1) Odabir biljke



Morska lavanda
(*Limonium pruinosum* L. Chaz.).

2) Sakupljanje i obrada biljnog materijala



a) SAKUPLJANJE BILJNOG TKIVA



b) PRANJE I SUŠENJE



c) USITNJAVANJE



3) Priređivanje vodenog biljnog ekstrakta



a) VAGANJE

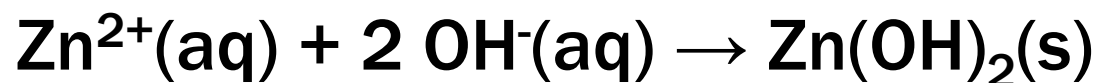
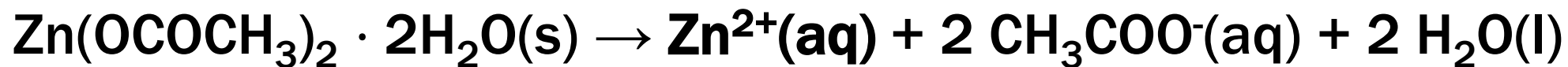
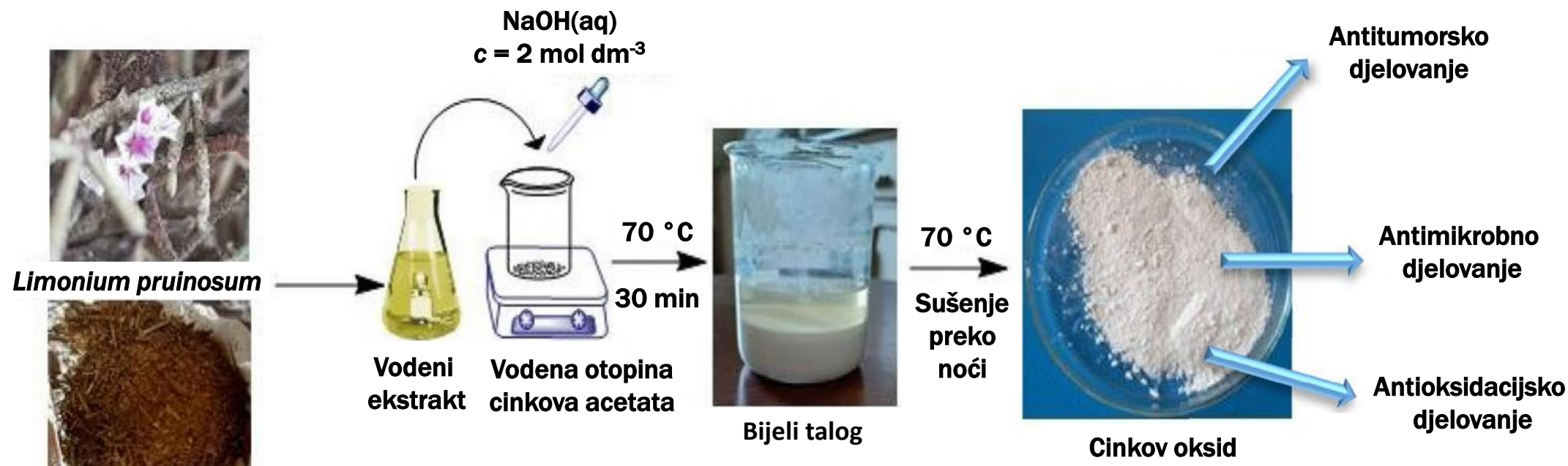


b) MIJEŠANJE S VODOM I
GRIJANJE; 70 °C, 30 min



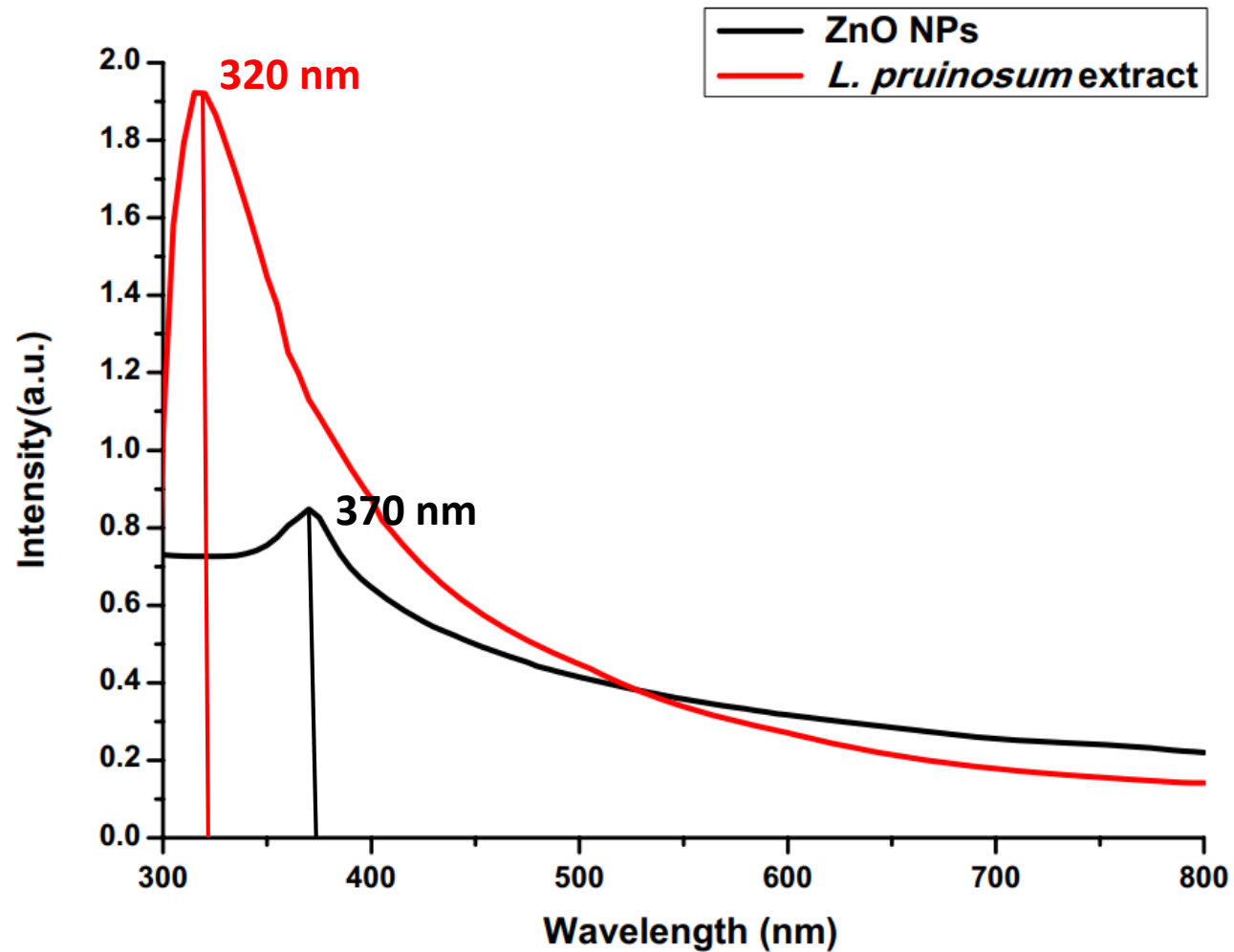
c) FILTRIRANJE

4) Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida



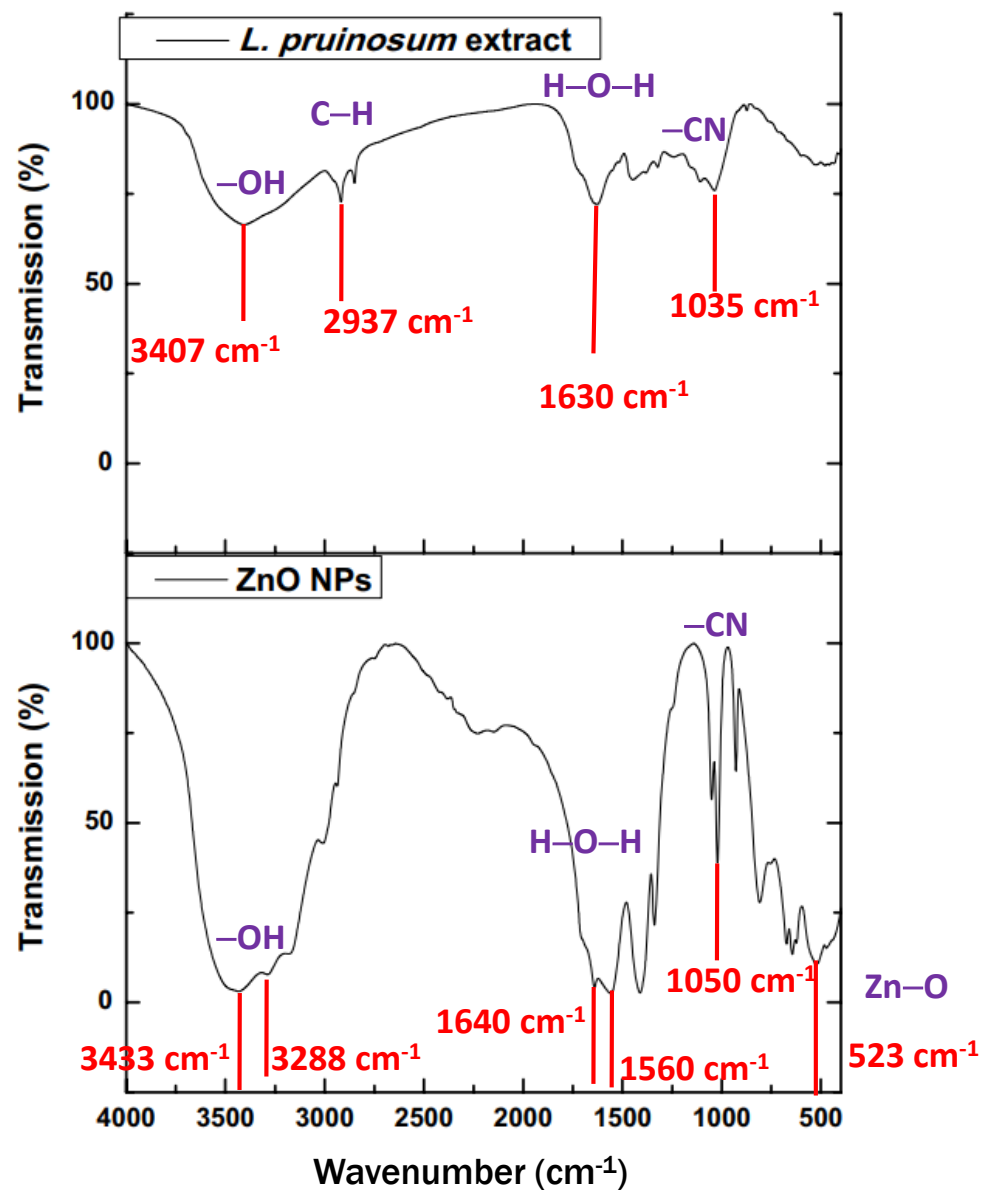
5) Karakterizacija nanočestica cinkova oksida

5.1. UV/Vis spektrofotometrija



UV-Vis spektar nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom (ZnO NPs) i vodenog ekstrakta morske lavande (*L. pruinosa* extract).

5.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR)

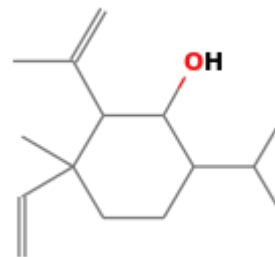


FT-IR spektar nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom (ZnO NPs) i vodenog ekstrakta morske lavande (*L. pruinosa* extract).

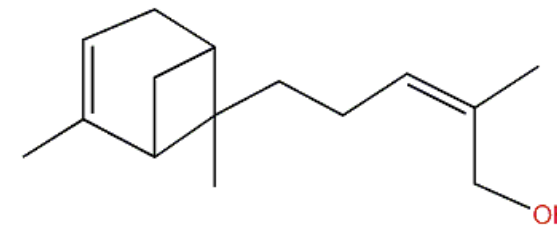
5.3. Fitokemijski probir

- GC-MS

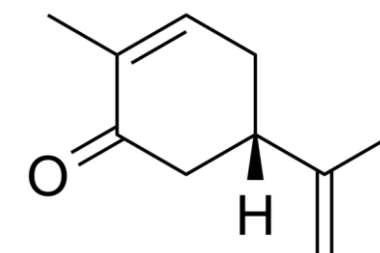
(eng. *gas chromatography - mass spectrometry*)



6-EPI-ŠIOBUNOL



BERGAMOTOL



KARVON

Br.	Naziv spoja	Kemijska formula	Klasa spoja	Retencijsko vrijeme (min)	Površina ispod "pika" (%)
1	Karvon	$C_{10}H_{14}O$	p-mentanski monoterpenoid	12,79	2,93
2	Bergamotol	$C_{15}H_{24}O$	seskviterpenoid	19,72	6,13
3	6-epi-šioibunol	$C_{15}H_{26}O$	seskviterpenoid	23,09	11,51
4	Bisabolol oksid A	$C_{15}H_{26}O_2$	oksan	25,10	6,49
5	Heksadekanska kiselina, TMS	$C_{19}H_{40}O_2Si$	ester	31,29	11,67
6	Oleinska kiselina (Z)-, TMS	$C_{21}H_{42}O_2Si$	ester	34,37	3,66
7	Monolinolein, TMS	$C_{27}H_{54}O_4Si$	ester	37,93	2,16

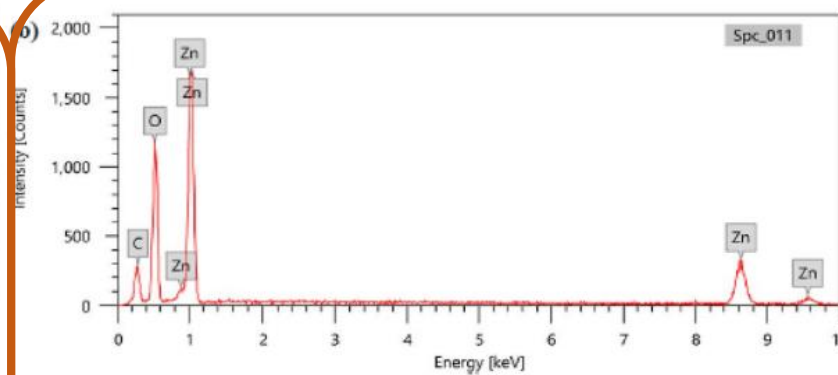
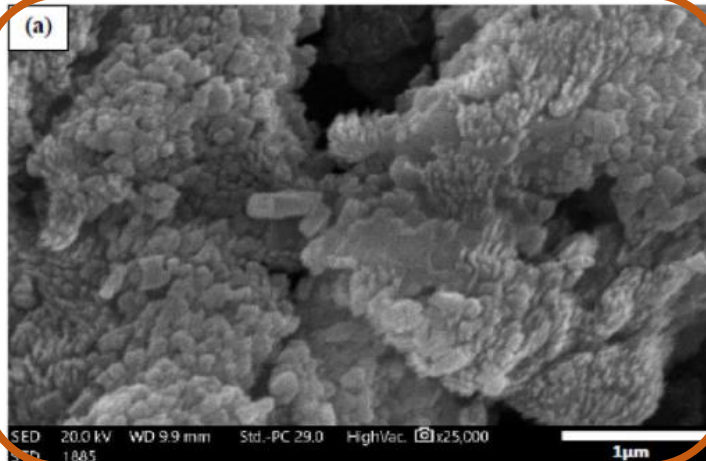
Identifikacija spojeva izvedena je na temelju uspoređivanja retencijskih vremena, odnosno masenih spektara s onima iz GC-MS spektralnih baza podataka (WILEY 09 i NIST 11).

TMS jest kratica za trimetilsilil- skupinu koja s naznačenom supstancijom tvori ester.

5.4. SEM, TEM i EDX analiza

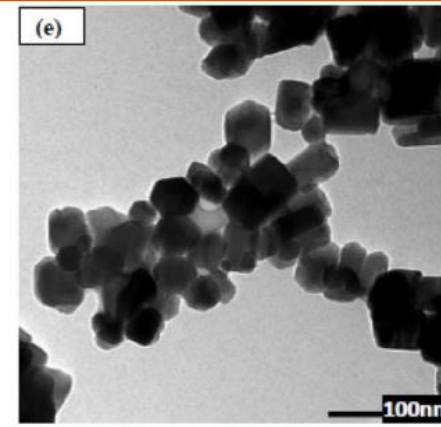
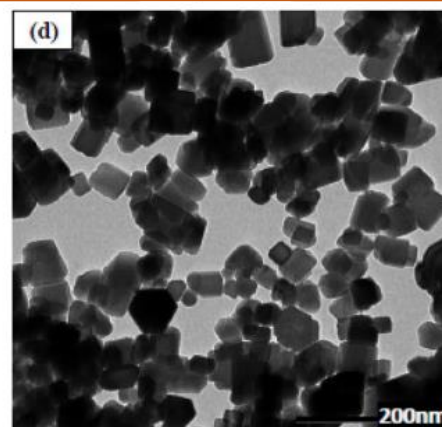
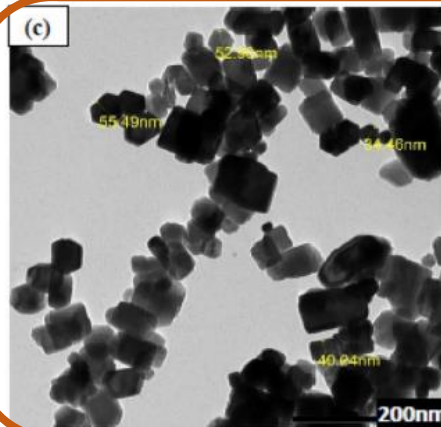
- SEM – pretražna elektronska mikroskopija (eng. *scanning electron microscopy*)
- TEM – transmisijska elektronska mikroskopija (eng. *transmission electron microscopy*)
- EDX – energijski razlučujuća rendgenska analiza (eng. *energy dispersive X-ray analysis*)

SEM



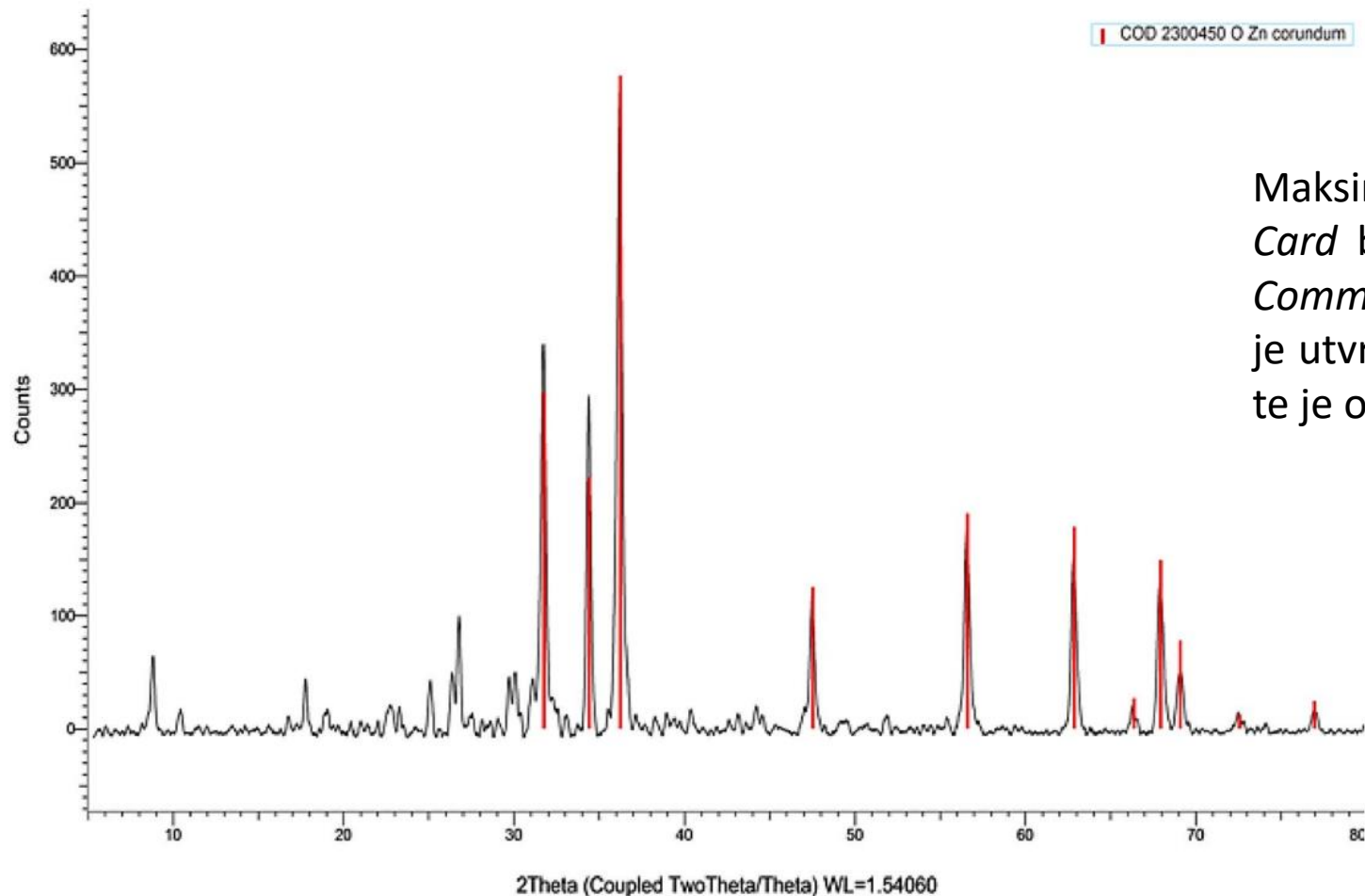
EDX

TEM



5.5. Difrakcija rendgenskog zračenja (XRD)

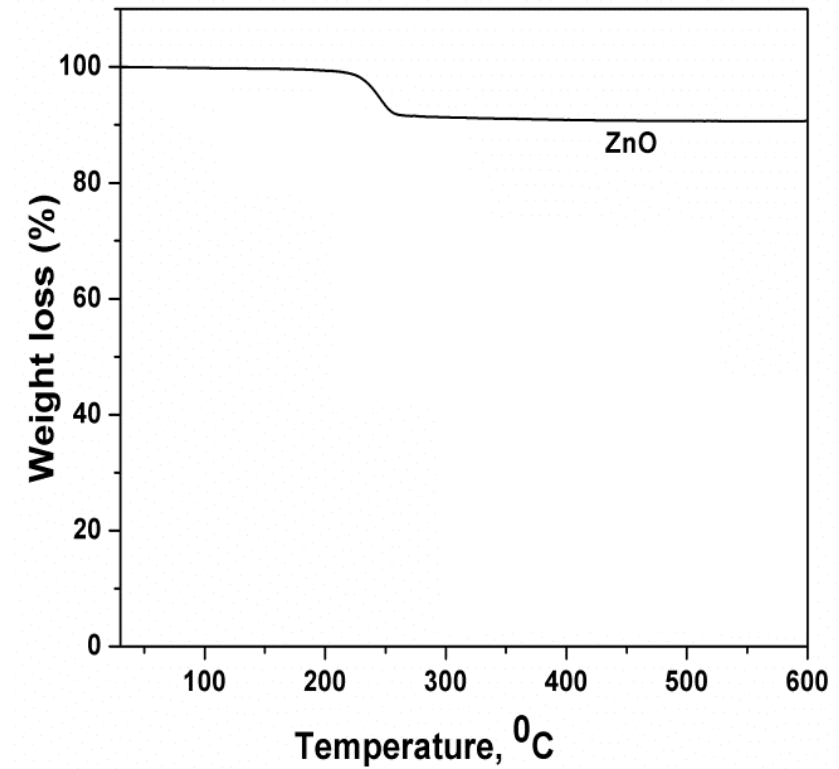
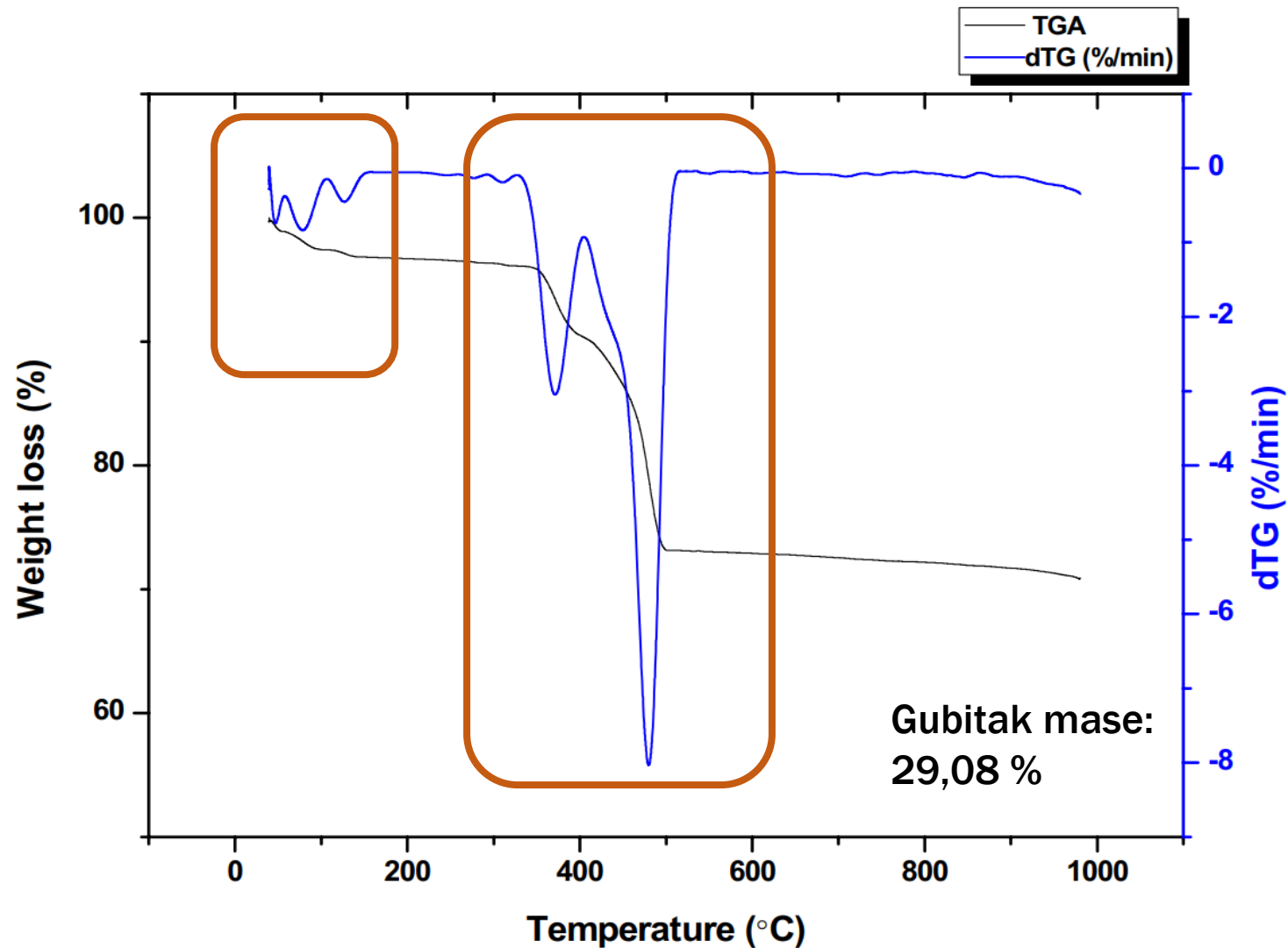
- (eng. *X-ray diffraction*)



Maksimumi su uspoređeni s podacima iz *JCPDS Card* baze difraktometrijskih podataka (eng. *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) čime je utvrđena heksagonska kristalna struktura uzorka te je određena prostorna grupa $P6_3mc$.

Difraktogram polikristalnog uzorka nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom.

5.6. Termogravimetrija (TG)

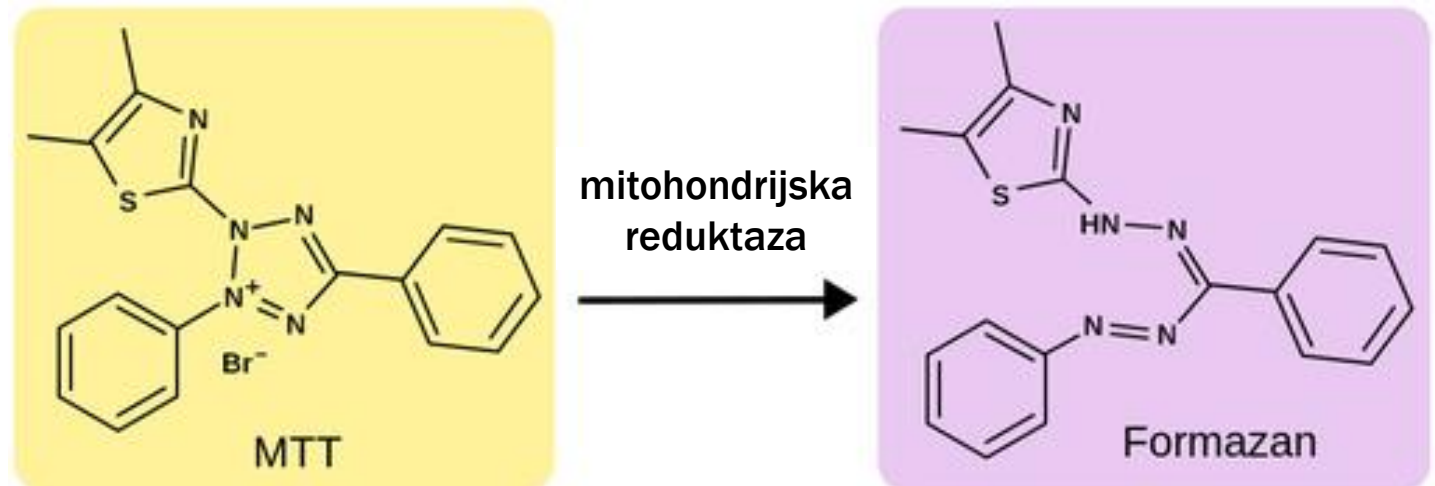
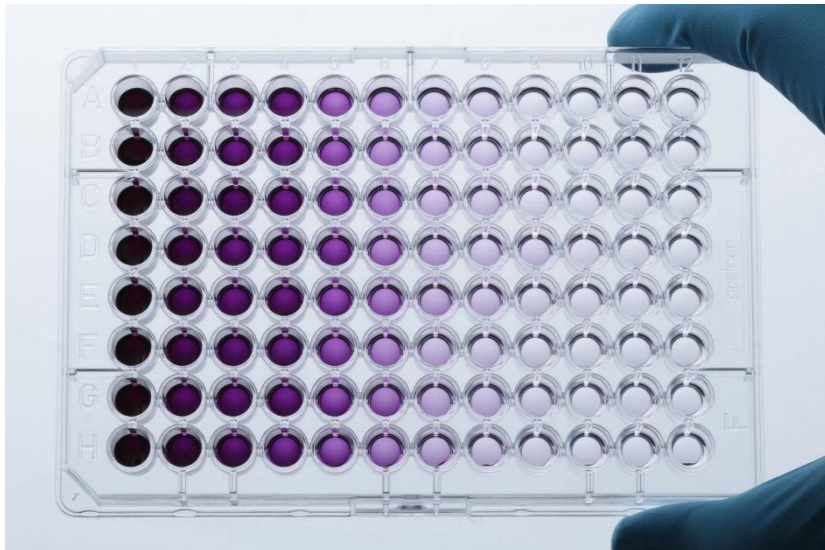


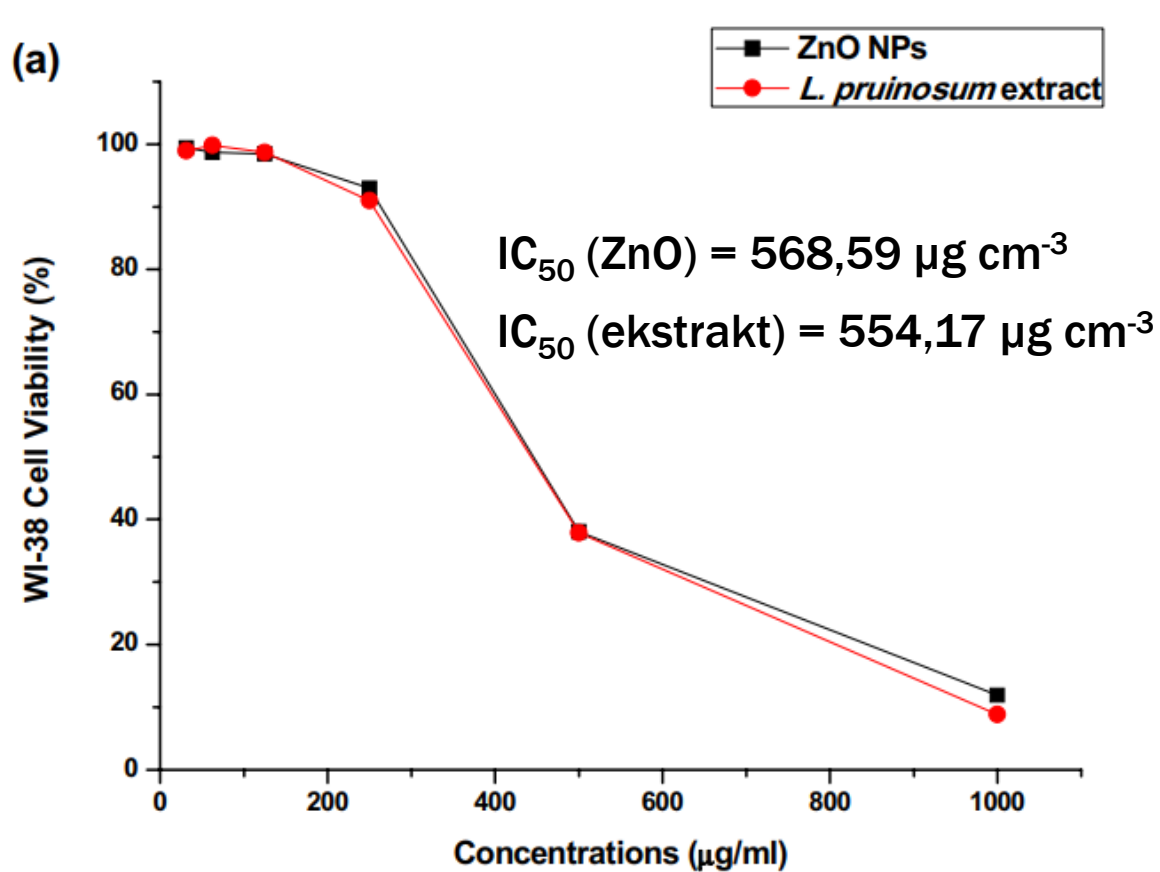
TGA krivulja cinkova oksida dobivenog klasičnom sintezom.

TGA i DTG krivulje uzorka nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom.

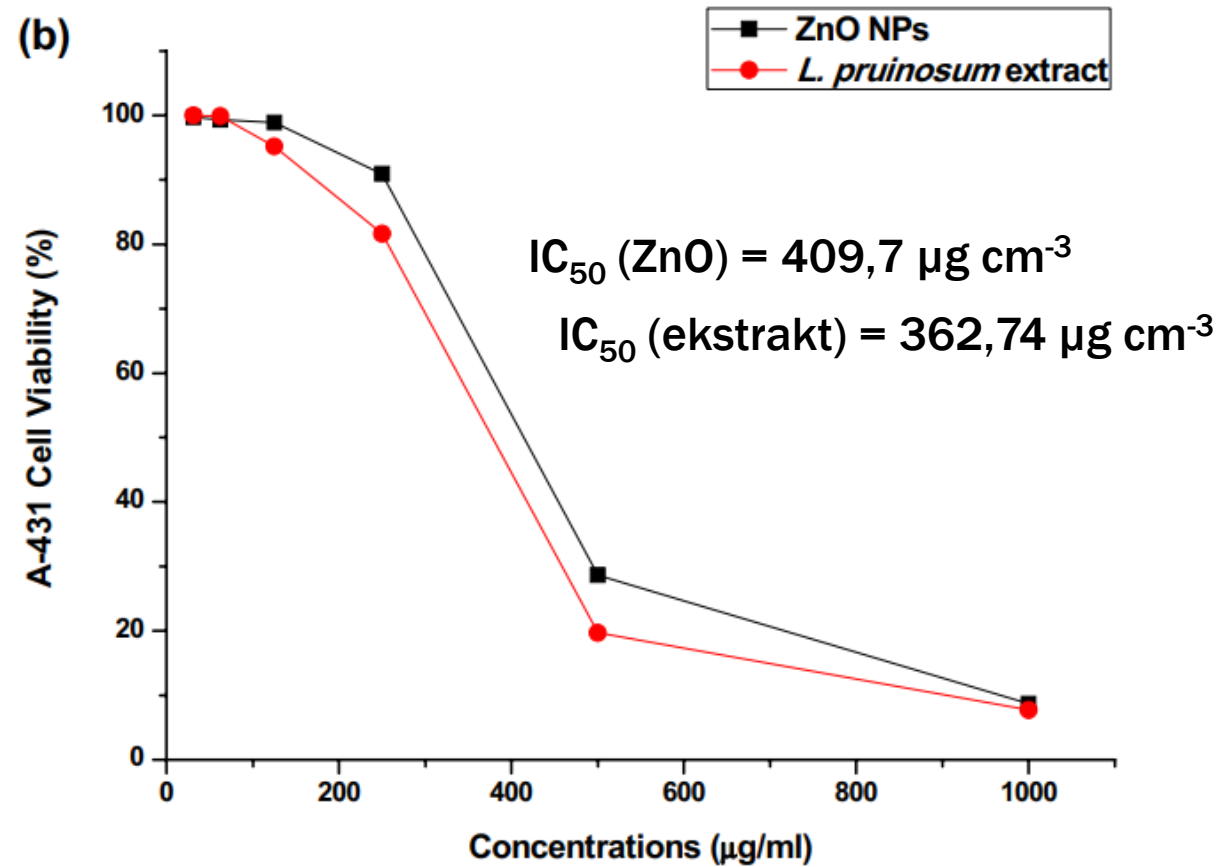
6) Utvrđivanje citotoksičnosti / antitumorskog djelovanja

- **Test MTT** (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)
- Modelne humane stanične linije raka kože (A-431)
- Normalne humane stanične linije plućnog fibroblasta (WI-38)
- Izloženi su različitim koncentracijama nanočestica i vodenog ekstrakta morske lavande (31, 25, 62,5, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g cm}^{-3}$)





Zdrave stanice (WI-38)

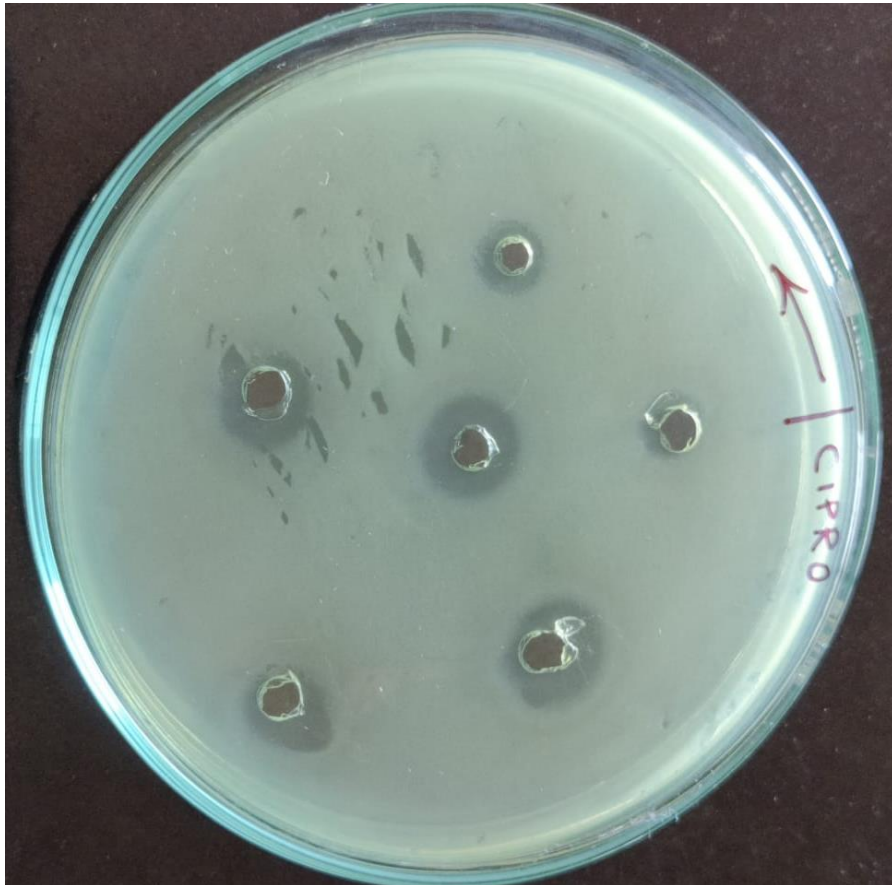


Tumorske stanice (A-431)

Prikaz ovisnosti stanične vijabilnosti (%) zdravih (a) i tumorskih (b) stanica o koncentraciji nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom (ZnO NPs) i vodenog ekstrakta morske lavande (*L. pruinosa* extract).

7) Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti

- metoda difuzije u jažicama (eng. *well diffusion method*)



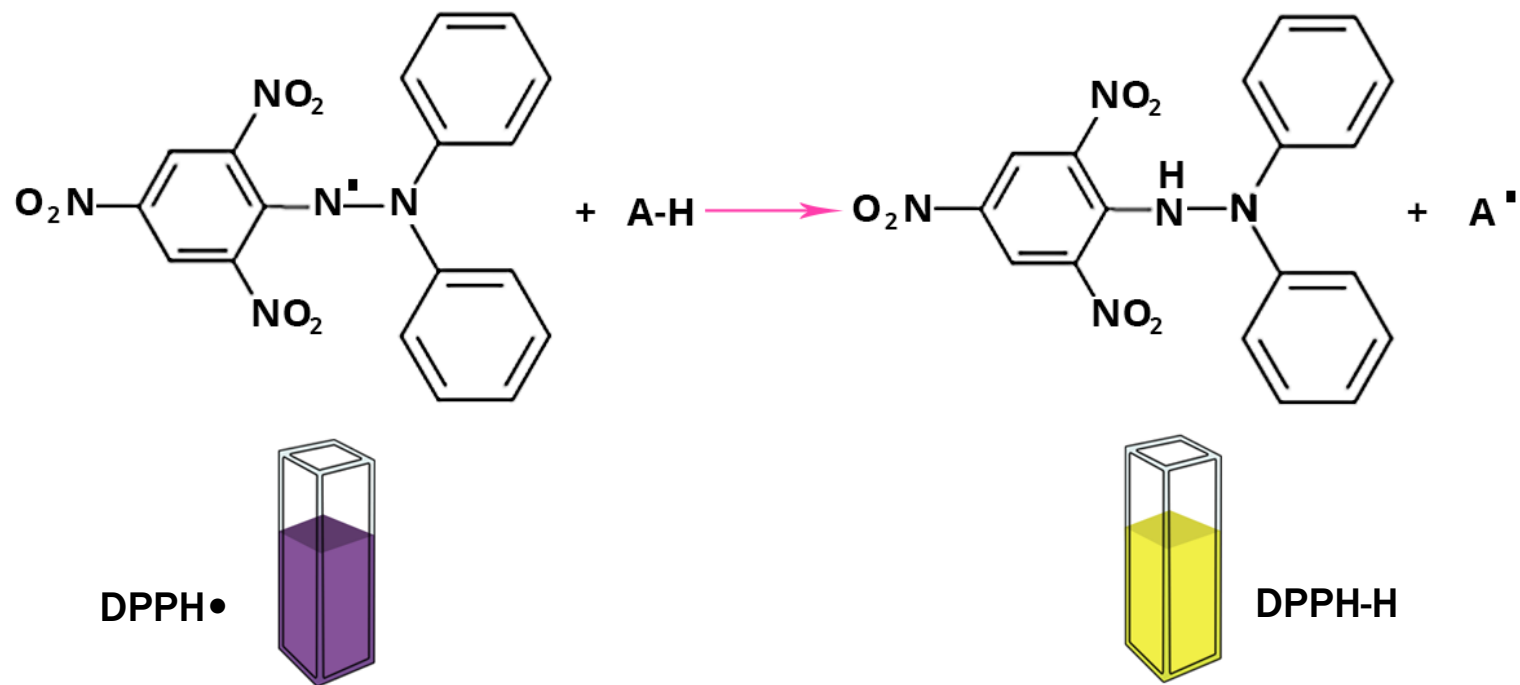
Ilustracija metode difuzije u jažicama.

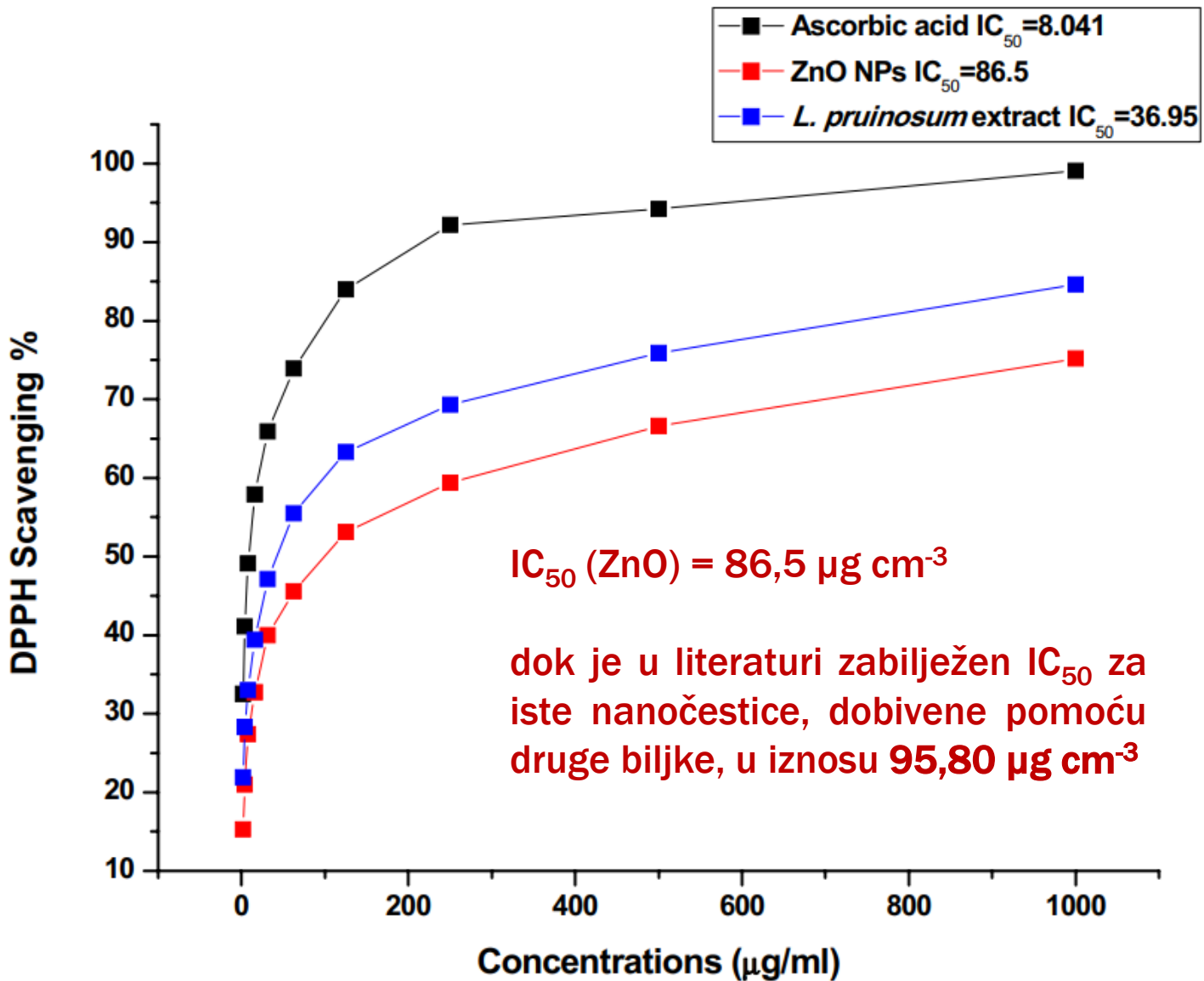
Patogeni mikroorganizam	Biljni ekstrakt	Nanočestice ZnO	Gentamicin (kontrola)
<i>Bacillus subtilis</i>	20	24	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	26	15
<i>Escherichia coli</i>	31	29	17
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	16	20	16
<i>Candida albicans</i>	29	28	23
<i>Aspergillus flavus</i>	11	14	20

Promjeri zonâ inhibicije mikrobnog rasta (mm) uz vodeni ekstrakt morske lavande (biljni ekstrakt), nanočestice cinkova oksida dobivene zelenom sintezom (ZnO) i gentamicin.

8) Utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti

- **DPPH metoda** (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat)
- Priređen je niz razrjeđenih otopina nanočestica i biljnog ekstrakta: 1,95, 3,9, 7,8125, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g cm}^{-3}$.





$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_K - A_A}{A_K} \times 100$$

DPPH Scavenging %

- postotak redukcije DPPH• koji se još naziva i kapacitet "hvatanja" radikala (RSC, eng. *radical scavenging capacity*)

Antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta morske lavande, nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom i askorbinske kiseline.

Zaključak

- Na tragu povećane ekološke osviještenosti i naklonjenosti zelenoj kemiji, broj istraživačkih radova vezanih za zelenu sintezu nanočestica metalnih oksida u stalnom je porastu.
- Rad, prema kojem je izrađen ovaj seminar, opisuje uspješnu i učinkovitu zelenu sintezu nanočestica cinkova oksida korištenjem vodenog ekstrakta morske lavande (*Limonium pruinosum* L. Chaz.). Po prvi put je zabilježena upotreba ove biljke, ali i cinkova acetata dihidrata kao novog prekursora.
- Ustanovljena je značajna citotoksična aktivnost dobivenih nanočestica prema tumorskim stanicama (stanične linije A-431), ukazujući na njihov visoki antitumorski potencijal, dok manja toksičnost prema zdravim stanicama (stanične linije WI-38) upućuje na njihovu biokompatibilnost.
- Nanočestice cinkova oksida dobivene zelenom sintezom, kao i vodeni ekstrakt morske lavande pokazali su izuzetnu antimikrobnu aktivnost u usporedbi sa standardnim antibiotikom gentamicinom.
- Zahvaljujući brojnim fitokemikalijama s reducirajućim svojstvima, nanočesticama i biljnom ekstraktu utvrđeno je stanovito antioksidacijsko djelovanje.
- Stoga, opisana održiva, ekološki i ekonomski prihvatljiva metoda sinteze nanočestica koje odlikuju antitumorska, antimikrobna i antioksidacijska svojstva značajan je znanstveni iskorak u smjeru razvoja novih nanomaterijala s primjenom u biomedicini.

Mrežni izvori fotografija i ilustracija

- B. Naiel, M. Fawzy, M. W. A. Halmy, A. E. D. Mahmoud, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Sea Lavender (*Limonium pruinatum* L. Chaz.) extract: characterization, evaluation of anti-skin cancer, antimicrobial and antioxidant potentials, *Sci. Rep.* 12 (2022) 1–12. doi: 10.1038/s41598-022-24805-2.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781455731954000011>
- <https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>
- https://www.researchgate.net/publication/314237409_Honey_Mediated_Green_Synthesis_of_Nanoparticles_New_Era_of_Safe_Nanotechnology
- <https://labindia-analytical.com/product/analytical-products/milling/planetary-ball-mill-bm-1200>
- <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ra/c8ra08982e>
- <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/18/6362#>
- <https://inaturalist.nz/taxa/496107-Limonium-pruinatum>
- <https://www.nature.scot/landscapes-and-habitats/habitat-types/coast-and-seas/coastal-habitats/saltmarsh>
- <https://www.haines.com.au/digital-balance-1kg-x-0-01g.html>
- <https://www.mooreanalytical.com/gc-ms/>
- <https://webbook.nist.gov/cgi/formula?ID=C69350614&Mask=2000>
- <https://www.medchemexpress.com/s-carvone.html>
- <https://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-Z-alpha-trans-bergamotol.php>
- <https://www.integra-biosciences.com/japan/en/applications/mtt-assay-assist-plus-pipetting-robot>
- <https://theory.labster.com/mtt-assay/>
- https://www.researchgate.net/figure/TGA-curves-of-soy-protein-zinc-oxide-and-Soy-ZnO-bionanocomposite_fig3_333999037
- <https://www.challenge.jp.net/well-diffusion-assay-k.html>
- <https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>