

Utjecaj koncentracije ekstrakta melise (*Melissa officinalis*) na biosintezu nanočestica željeza

Drenovac, Maja

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:146343>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Maja Drenovac

0058217830

UTJECAJ KONCENTRACIJE EKSTRAKTA MELISE
(*Melissa officinalis*) NA BIOSINTEZU NANOČESTICA
ŽELJEZA

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

Prijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo

Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj koncentracije ekstrakta melise (*Melissa officinalis*) na biosintezu nanočestica željeza

Maja Drenovac, 0058217830

Sažetak: Biosinteza nanočestica iz biljnih ekstrakata se bazira na antioksidativnoj moći bioaktivnih komponenti prirodno prisutnih u biljkama (polifenoli, flavonoidi, organske kiseline). To je ekološki prihvatljiviji, jednostavniji i jeftiniji način sinteze nanočestica naspram dosadašnjih fizikalno-kemijskih metoda. Cilj rada je utvrđivanje utjecaja koncentracije biljnog ekstrakta melise (2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) na biosintezu nanočestica željeza korištenjem 0,1 M otopine FeCl_3 kao prekursora. Provedena su mjerenja pH i vodljivosti, kolorimetrija uzoraka ekstrakata i nanočestica, spektroskopske metode (FTIR, UV-Vis, NIR) te je određen hidrodinamički promjer nanočestica. Također, određivana je ukupna količina polifenola u ekstraktu korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa te antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Utvrđeno je kako se porastom koncentracije biljnog ekstrakta povećava masa sintetiziranog praha. Nastanak nanočestica je potvrđen FTIR i UV-Vis metodama koja pokazuju prisutnost stabilizirajućih funkcionalnih skupina.

Ključne riječi: biosinteza, biljni ekstrakt, nanočestice željeza, koncentracija, melisa

Rad sadrži: 35 stranica, 11 slika, 8 tablica, 44 literaturnih navoda, 0 priloga

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: 5. srpanj, 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

Influence of *Melissa officinalis* extract concentration on biosynthesis of iron nanoparticles

Maja Drenovac, 0058217830

Abstract: Biosynthesis of nanoparticles from plant extracts is based on the antioxidant power of bioactive components naturally present in plants (polyphenols, flavonoids, organic acids). It is an environmentally friendly, simpler and cheaper way of synthesizing nanoparticles compared to other physico-chemical methods. The aim of this work was to determine the influence of the concentration of lemon balm plant extract (2.5%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) on the biosynthesis of iron nanoparticles using a 0.1 M solution of FeCl₃ as a precursor. Measurements of pH and conductivity, colorimetry of samples of extracts and nanoparticles, spectroscopic methods (FTIR, UV-Vis, NIR) were performed, and the hydrodynamic diameter of nanoparticles was determined. Also, the total amount of polyphenols in the extract was determined using the Folin-Ciocalteu reagent and the antioxidant activity using the DPPH method. It was concluded that the mass of particles obtained increases with the increase in the concentration of the plant extract. The formation of nanoparticles was confirmed by FTIR and UV-Vis methods, which show the presence of stabilizing functional groups.

Keywords: biosynthesis, plant extract, iron nanoparticles, concentration, lemon-balm

Thesis contains: 35 pages, 11 figures, 8 tables, 44 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is 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 5th, 2023

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. SINTEZA NANOČESTICA	2
2.1.1. ZELENA SINTEZA	3
2.2. MELISA	6
2.3. NANOČESTICE ŽELJEZA I NJIHOVA PRIMJENA	6
2.4. REAKCIJSKI PARAMETRI.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. UZORCI	10
3.1.2. PRIBOR I APARATURA.....	10
3.1.3. OTAPALA I REAGENSI	12
3.2. METODE.....	12
3.2.1. PRIPREMA EKSTRAKTA MELISE.....	12
3.2.2. PRIPREMA OTOPINE PREKURSORA	12
3.2.3. SINTEZA NANOČESTICA	12
3.2.4. ODREĐIVANJE BOJE OTOPINE	13
3.2.5. ODREĐIVANJE VODLJIVOST	13
3.2.6. ODREĐIVANJE PH	13
3.2.7. KONTINUIRANI UV SPEKTAR	13
3.2.8. ODREĐIVANJE HIDRODINAMIČKOG PROMJERA METODOM DINAMIČKOG RASPRŠENJA SVJETLOSTI.....	14
3.2.9. FTIR (INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM).....	14
3.2.10. NIR SPEKTROSKOPIJA.....	14
3.2.11. KEMIJSKA ANALIZA SUPERNATANTA I POLAZNOG EKSTRAKTA	14

UKUPNI POLIFENOLI	14
ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	15
3.2.12. ANALIZA SVJETLOSNIM MIKROSKOPOM	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. MASA SINTETIZIRANOG PRAHA	17
4.2. ODREĐIVANJE BOJE OTOPINE	18
4.3. ODREĐIVANJE VODLJIVOSTI PRIJE SINTEZE I NAKON SINTEZE NANOČESTICA	21
4.4. ODREĐIVANJE PH	22
4.5. KONTINUIRANI UV SPEKTAR	23
4.6. ODREĐIVANJE HIDRODINAMIČKOG PROMJERA METODOM DINAMIČKOG RASPRŠENJA SVJETLOSTI (DLS)	25
4.7. FTIR (INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM).....	26
4.8. NIR SPEKTROSKOPIJA.....	27
4.9. KEMIJSKA ANALIZA SUPERNATANTA I POLAZNOG EKSTRAKTA	28
4.9.1. UKUPNI POLIFENOLI	28
4.9.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	29
4.10. MIKROSKOPSKA SLIKA NANOČESTICA.....	30
5. ZAKLJUČCI.....	31
6. POPIS LITERATURE.....	32

1. UVOD

Nanotehnologija je brzo rastuće područje znanosti koje se bavi proizvodnjom i dizajniranjem materijala na razini od 1 do 100 nm (Cushen i sur., 2012). Napredak ove discipline je doveo do razvoja novih vrsta nanomaterijala, konkretno metalnih nanočestica (željezo, zlato, srebro, kobalt, nikal, platina) koje se danas uspješno sintetiziraju na industrijskom nivou i nalaze primjenu u mnogim granama industrije kao što su prehrambena i farmaceutska, agronomija te biomedicina (Benković i sur., 2023). Nanočestice željeza, točnije, oksida željeza se primjenjuju zbog svog antibakterijskog, antifungalnog i antikancerogenog djelovanja (Sangaiya i Jayaprakash, 2018). Također, imaju upotrebu kod tretiranja otpadnih voda tako što uspješno uklanjaju kontaminante organskog i anorganskog podrijetla (Yan i sur., 2013).

Tijekom godina razvijene su mnoge fizikalne i kemijske metode sinteze nanočestica, ali njihova mana je potencijalno štetno djelovanje na okoliš te u konačnici i na zdravlje ljudi. Agresivne kemikalije su se zamijenile upotrebom različitih biokatalizatora dobivenih iz biljnih ekstrakata, gljiva, kvasaca i bakterija što predstavlja „zelenu“ metodu sinteze nanočestica (Benković i sur., 2023). Ova metoda se oslanja na antioksidativnu moć bioaktivnih komponenti koje su rezultat sekundarnog metabolizma navedenih mikroorganizama ili su prirodno prisutne u biljkama. Osim što je zelena sinteza ekološki prihvatljiva, brza je, jeftina, lako joj je povećati razmjere te nema potrebe za korištenjem visokog tlaka i temperature prema čemu je ukupni energetska trošak manji (Gottimukkala, 2017).

Ovaj rad je fokusiran na biosintezu nanočestica korištenjem biljnog ekstrakta melise. Sintezu nanočestica željeza korištenjem biljnih ekstrakata se postiže miješanjem biljnog ekstrakta s prekursorom što je najčešće jedna od željezovih soli. Bioaktivne molekule iz biljke reduciraju ione željeza u nanočestice te posjeduju fenolne i hidroksilne skupine koje ih stabiliziraju. Neke od molekula koje imaju ovu sposobnost su polifenoli, flavonoidi, organske kiseline (Ebrahiminezhad i sur., 2018). Melisa je ljekovita biljka bogata flavonoidima koji imaju antioksidativno djelovanje (Bordbar i sur., 2018) te je prema tome uzeta kao izvor bioaktivnih molekula za redukciju i sintezu nanočestica željeza. Cilj ovog rada je utvrđivanje utjecaja različitih koncentracija ekstrakta melise (2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % i 100 %) na sintezu nanočestica željeza, uz korištenje 0,1 M otopine FeCl_3 kao prekursora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sinteza nanočestica

„Zelena kemija“ predstavlja alternativu upotrebi štetnih kemikalija i procesa radi ozbiljnih posljedica koje se odražavaju na okoliš. Teži se razvijanju novih procesa, metoda i alata uz održivo korištenje prirodnih resursa i smanjenje mogućih štetnih utjecaja na okoliš te u konačnici, zdravlje ljudi i životinja. Zbog toga se sve više istražuju i primjenjuju zeleni procesi proizvodnje među kojima je i sinteza nanočestica primjenom biljnih ekstrakata, algi i različitih mikroorganizama (Castillo-Henríquez i sur., 2020).

Dva osnovna pristupa sintezi nanočestica su „top down“ i „bottom up“ sinteza. Top down način predstavlja smanjenje čestica većih dimenzija u nanočestice korištenjem kemijskih i fizikalnih metoda (Cushen i sur., 2012). Fizikalni pristup uključuje tehnike poput laserske ablacije, litografije i visokoenergetskog zračenja (Shah i sur., 2015). Nanočestice dobivene na ovaj način imaju nizak stupanj kontaminacije, a veličina i oblik čestica su dobro definirani. Također, postoji mogućnost kontrole stabilnosti, oblika i veličine nanočestica podešavanjem reakcijskih parametara kao što su koncentracija i pH (Benković i sur., 2023). Negativna strana je značajna potrošnja energije i nesavršenosti površinske strukture nanočestica što rezultira promjenama njihovih fizikalno-kemijskih svojstava koja su zaslužna za njihovu specifičnu funkciju (Ebrahiminezhad i sur., 2018; Mittal i sur., 2013). Stabilizirajući i reducirajući agensi organske i anorganske prirode, korišteni tijekom „top down“ pristupa, mogu biti skupi i imati negativan utjecaj na okoliš zbog štetnih nusprodukata koje je teško zbrinuti. Također, nanočestice koje su sintetizirane na ovaj način mogu imati veću reaktivnost i toksičnost što bi moglo izazvati nepoželjne efekte na zdravlje ako bi se koristile u medicinske svrhe (Gour i Jain, 2019; Ali i sur., 2016).

„Bottom up“ pristup uključuje stvaranje nanočestica iz malih jedinica kao što su atomi i molekule ili putem spontanog sastavljanja atoma u nove jezgre koje dalje rastu u čestice nano dimenzija (Jadoun i sur., 2021). Konkretno, metalni prekursori (metalni ioni) se koriste kao svojevrsne klice za sintezu metalnih nanočestica. Glavne reakcije koje se odvijaju kod ovakve proizvodnje nanočestica su oksidacija i redukcija, a dobivene nanočestice imaju minimalna oštećenja i homogenu kemijsku strukturu. Nadalje, ovakvim pristupom je moguće recikliranje soli metala koje su skupe, a resursi ograničeni (Hussain i sur., 2016). Ono što

može predstavljati problem kod „bottom up“ načina jest nemogućnost kontrole oblika i veličine nanočestica upravo zbog spontanog sastavljanja atoma na molekularnoj razini (Benković i sur., 2023).

2.1.1. Zelena sinteza

Zelena sinteza spada u „bottom up“ pristup te postoje sličnosti s kemijskom redukcijom, ali kemikalije koje služe kao reducirajući agensi za sintezu nanočestica su zamijenjene biljnim ili mikrobiološkim materijalom. Ona je ekološki prihvatljiv način sinteze nanočestica korištenjem biljaka i mikroorganizama, a odvija se u jednom koraku (Jadoun i sur., 2021; Hussain i sur., 2016). Biosinteza je vrlo privlačna metoda jer se proizvode nanočestice koje nisu potencijalno reaktivne i toksične te su jeftinije i stabilnije, za razliku od čestica nastalih kemijskim metodama koje mogu izazvati štetne učinke na zdravlje (Puthukkara i sur., 2021; Gour i Jain, 2019). Moguće je koristiti kombinaciju kemijskih i bioloških reducensa kako bi se umanjio štetan učinak i pojeftinio postupak (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Organizmi koje je moguće koristiti za biosintezu nanočestica su bakterije, gljive, kvasci, alge i biljke u kojima se sinteza može odvijati *in vivo*, dok se korištenjem biljnih ekstrakata odvija *in vitro* gdje se ekstrakt miješa s otopinom soli u određenom omjeru (Hussain i sur., 2016). Mnogim istraživanjima je dokazano kako su biljke i njihovi ekstrakti najpogodniji supstrati za biosintezu. Nanočestice proizvedene korištenjem biljnih ekstrakata su stabilnije nego one nastale iz mikroorganizama te je sama sinteza brža. Uz to, za razliku od mikroorganizama, korištenje biljaka ne zahtjeva specijalizirane, kompleksne i višestupanjske procedure poput izolacije i pripreme kultura koje znaju biti skupe (Shah i sur., 2015; Iravani, 2011).

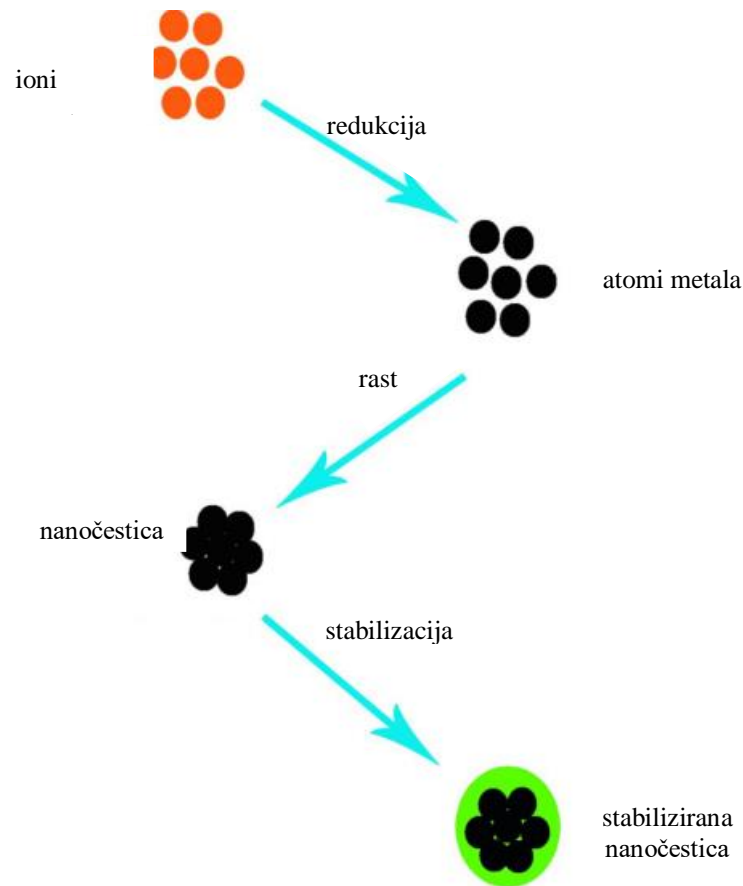
Ekstrakti dobiveni iz raznih dijelova biljaka (listova, kore, plodova, korijenja, stabljike, sjemenki, ljuski) upotrebljavaju se za sintezu raznih nanočestica zbog prisutnosti fitokemikalija tj. biološki aktivnih kemijskih spojeva u njihovim ekstraktima koji se koriste kao reducirajući i stabilizirajući agensi za izvanstaničnu sintezu metalnih nanočestica (Jadoun i sur., 2021; Castillo-Henríquez i sur., 2020). Stoga, ekstrakti su odličan medij za sintezu zbog svoje dostupnosti, mogućnosti prilagodbe za masovnu proizvodnju i neštetnosti otpadnih tvari (Hussain i sur., 2016). Zbog biljne raznolikosti, moguće je kontrolirati morfološka obilježja i veličinu nanočestica mijenjanjem biljke čiji ekstrakt se koristi (Fahmy i sur., 2018). Međutim, moguće su razne varijacije kemijskog sastava ekstrakata kod istih vrsta dobivenih

u različito doba godine i sa različitim geografskih područja. Prema tome, dva istraživanja koja su koristila istu vrstu mogu dobiti različite rezultate što može negativno utjecati na dosljednost fizikalnih i kemijskih svojstava (Shah i sur., 2015). Obično se pokušavaju koristiti ekstrakti iz neprehrambenih izvora poput trava i drveća kako bi se smanjili troškovi proizvodnje. Također, reakcije zelene sinteze se provode na sobnoj temperaturi što doprinosi smanjenju troškova (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Sinteza nanočestica iz biljnih ekstrakata uz soli metala kao prekursor započinje miješanjem biljnog ekstrakta sa soli metala čije nanočestice se želi proizvesti. Biokemijska redukcija iona metala započinje odmah, a formacija nanočestica je okom vidljiva promjenom boje. Sam mehanizam sinteze sastoji se od nekoliko koraka (slika 1). Metalni ioni se vežu za bioaktivne komponente pri čemu prelaze iz jednovalentnog i dvovalentnog oksidacijskog stanja u multivalentno stanje nakon čega slijedi nukleacija reduciranih atoma metala. Nukleaciju prati rast čestica zbog udruživanja manjih susjednih čestica u veće s ciljem postizanja termodinamičke stabilnosti. Kako rast napreduje, nanočestice se nakupljaju i stvaraju različite oblike nalik na kocke, sfere, trokute, heksagone i dr. U krajnjem koraku, sposobnost komponenti otopljenih u biljnom ekstraktu da stabiliziraju nastale nanočestice određuje oblik koji je energetski najpovoljniji. Svojstva kao što su koncentracija ekstrakta i prekursora, pH i temperatura značajno utječu na kvalitetu, veličinu i morfološka obilježja sintetiziranih čestica (Shah i sur., 2015).

Osim što zelena sinteza pruža jeftinu, brzu i ekološki prihvatljivu verziju proizvodnje nanočestica, ona ne zahtjeva upotrebu stabilizirajućih sredstava jer fitokemikalije odgovorne za samu sintezu djeluju kao stabilizatori nastalih nanočestica čime se broj koraka same sinteze smanjuje. Korištenje samih biljnih ekstrakata u medicini je ograničeno zbog veličine fitokemikalija u usporedbi s ciljanim strukturama u koje se želi prodrijeti. Prema tome, nanočestice proizvedene biljnim ekstraktima na sebi mogu sadržavati aktivne funkcijske skupine s blagotvornim djelovanjem i zbog svojih dimenzija im je omogućen prodor kroz membrane raznih struktura. Dodatno, površine nanočestica selektivno adsorbiraju biomolekule kada dođu u kontakt s njima tvoreći ovojnicu koja pruža dodatnu stabilnost nanočesticama. Dakle, nanočestice nastale ovim putem su stabilnije iz razloga što su na svoju površinu vezale biološki aktivne komponente koje nalazimo u biljkama. Ovo svojstvo je osobito dobrodošlo ako su nanočestice korištene u medicinske svrhe u ljudskom organizmu, a

sintetizirane su korištenjem ljekovitog bilja koje sadrži obilje metabolita s farmakološkim djelovanjem. U kemijskoj ili fizikalnoj sintezi bi se ovaj korak morao naknadno napraviti, nakon što je sinteza već završena (Manolescu i sur., 2022; Singh i sur., 2016).



Slika 1. Shematski prikaz formacije i stabilizacije nanočestica (prema Ebrahiminezhadu i sur., 2018)

Točan mehanizam i komponente odgovorne za biosintezu posredovanu biljkama i biljnim ekstraktima još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali mnoga istraživanja daju naslutiti kako su upravo polifenoli, organske kiseline i proteini glavni reducirajući agensi te je moguće pretpostaviti kako različite fitokemikalije djeluju kao sinergisti (Castillo-Henríquez i sur., 2020; Singh i sur., 2016). Prema tome, za uspješnu i isplativu biosintezu nanočestica je poželjno birati biljke bogate ovim spojevima, a jedna od njih koja ih sadrži u izdašnim količinama je melisa.

2.2. Melisa

Melissa officinalis ili poznatije, matičnjak je trajna biljka koja prirodno raste na području Mediterana, sjeverne Afrike i zapadne Azije. To je jestiva ljekovita biljka čiji miris podsjeća na limun i metvicu, a pripada porodici Lamiaceae (Petrisor i sur., 2022; Noorul Basar i Zaman, 201). Melisa je poznata po svom sedativnom, antitumorskom, antimikrobnom i antioksidativnom djelovanju. Nadalje, ova ljekovita biljka pokazuje pozitivne učinke kod liječenja kognitivnih poremećaja Alzheimerove bolesti. Tradicionalno je korištena za ublažavanje tjeskobe, poremećaja spavanja, depresije i gastrointestinalnih smetnji (Silva i sur., 2023).

Kemijski sastav melise pokazuje kako uglavnom sadrži flavonoide, terpenoide, fenolne kiseline, tanine i eterično ulje. Glavni sastojci ove biljke su sadržani u listovima, a to su hlapljivi spojevi (geranil, neril, citronelal i geraniol), triterpeni (ursolna i oleanolna kiselina), flavonoidi (kvercetin, ramnocitrin, luteolin) i fenolne kiseline (ružmarinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina i klorogenska kiselina). Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji uključuju fenolne kiseline i flavonoide koji ispoljavaju mnoga biološka svojstva. Ovi spojevi sadrže kemijske strukturne elemente koji su odgovorni za antioksidativnu aktivnost. Fenolna kiselina koju melisa sadrži u najvećoj količini je ružmarinska (Petrisor i sur., 2022). Ružmarinska kiselina ima značajno antiviralno, antikancerogeno, antioksidativno, antidepresivno, protuupalno, kardioprotektivno, hepatoprotektivno i nefroprotektivno djelovanje (Silva i sur., 2023). Količina polifenolnih spojeva u biljci može varirati zbog čimbenika kao što su lokacija na kojoj raste, vrijeme berbe i pripremnih operacija kao što su sušenje i metoda ekstrakcije (Manolescu i sur., 2022).

2.3. Nanočestice željeza i njihova primjena

Nanočestice željeza privlače pažnju mnogih istraživača zbog jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava među kojima su visoka katalitička aktivnost, magnetičnost, niska toksičnost i sposobnost apsorpcije mikrovalova (Ebrahiminezhad i sur., 2018). Njihova velika specifična površina im omogućuje dobru interakciju s mnoštvom kemijskih spojeva, bili oni u tekućem ili plinovitom stanju (Abegunde i sur., 2020). Međutim, velika reaktivnost željeza, uglavnom s kisikom, ga mogu činiti teškim za proučavanje i nepraktičnim za primjenu (Ali i sur., 2016).

Tri najčešća oblika željezovog oksida u prirodi su magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) i

hematit (α - Fe_3O_4). Od toga Fe_3O_4 i γ - Fe_3O_4 pokazuju svojstva magnetičnosti pri djelovanju magnetskog polja, radi čega nalaze primjenu u biomedicini za dijagnostičku magnetsku rezonancu. Isto tako, nanočestice željeza su sposobne vezati antitijela, nukleotide, proteine, enzime i lijekove pa ih je moguće primjenjivati za gensku terapiju, kao nano-nosače cjepiva i za obnovu tkiva gdje su glavna dva faktora koji ih čine dobrim medijem za ovakve pothvate veličina i funkcionalnost površine. Za primjenu u medicini nanočestice željeza moraju biti netoksične i dovoljno male da mogu cirkulirati i kroz najsitnije kapilare tkiva i organa bez opasnosti da dođe do njihovog začepijavanja (Bruschi i Toledo, 2019.; Ali i sur., 2016). Biosintezom formirane čestice posjeduju i veću antimikrobnu aktivnost, nego one sintetizirane fizikalno-kemijskim metodama (Singh i sur., 2016).

Nanočestice željeza, posebice multivalentnog željeza, moguće je koristiti ne samo u medicinske svrhe, već i kao sredstvo za remedijaciju podzemnih voda i tla. Zagađenje tla i vode je u zabrinjavajućim razinama diljem svijeta, a pridonijeli su mu različiti faktori kao što su nepravilno upravljanje gradskim i industrijskim otpadom, izlivanje kemikalija u prirodu, industrije te prekomjerna uporaba umjetnih gnojiva i pesticida. Nanočestice multivalentnog željeza, uz prisutstvo kisika otopljenog u vodi, mogu oksidirati organske zagađivače čime oni prestaju biti štetni. Galdames i sur., (2020.) dokazali su kako nanočestice multivalentnog željeza imaju sposobnost reduciranja halogeniranih alifatskih spojeva u podzemnim vodama. Također, primjenjivo je za uklanjanje organskih zagađivača kao što su pesticidi, azoboje, antibiotici te bitnih anorganskih onečišćivača poput nitrata, arsena i teških metala. To je moguće radi magnetičnih svojstava i velike specifične površine koje pridonose redukcijskoj aktivnosti i omogućuje vezanje veće količine kontaminanata. Međutim, postoje loše strane koje uključuju potencijalnu agregaciju nanočestica i smanjenje reaktivnost koje je moguće umanjiti korištenjem stabilizirajućih sredstava (spojeva s antioksidacijskim djelovanjem) koja se vežu za površinu nanočestica. Također, postoji opasnost od nakupljanja veće količine nanočestica u određenim organizmima koji potencijalno mogu služiti kao hrana ljudi i životinja te rizik od degradacije nusprodukata koji s vremenom mogu postati toksični. No, kombinacija nanoremedijacije s drugim tehnologijama remedijacije bi se mogla pokazati kao rješenje ovom problemu (Puthukkara i sur., 2021; Galdames i sur., 2020).

Zbog svoje veličine, moguće ih je direktno ubrizgavati u tla i sustave podzemnih voda gravitacijom ili primjenom visokog tlaka te na taj način stvoriti vrlo fleksibilnu i efektivnu

tehnologiju obrade vode za lokacije koje imaju složene hidrogeološke karakteristike (Galdames i sur., 2020). Kako se u zadnje vrijeme sinteza nanočestica željeza sve više odvija korištenjem prirodno dobivenih polifenolnih spojeva iz biljaka i njihovih ekstrakata, ovaj način sinteze nudi mogućnost ubrizgavanja tih polifenolnih spojeva s redukcijskim djelovanjem u podzemne vode gdje reagiraju s željezom koje je ili prirodno prisutno ili je dospjelo u vodu iz drugih izvora. Mnoštvo hidroksilnih i fenolnih skupina prisutnih u ovim komponentama djeluju kao agensi koji stabiliziraju površine nanočestica i smanjuju njihovu toksičnost te se upravo na njih vežu onečišćivači poput azoboja (Yan i sur., 2013, Puthukkara i sur., 2021).

Nanočestice željeza nalaze primjenu i u: prehrambenoj industriji (konzerviranje hrane, odvajanje i pročišćavanje proteina), poljoprivredi (nanognojiva, nanosenzori, nanopesticidi) i kod magnetskih i električnih uređaja (transformatori, elektromagneti, motori) (Benković i sur., 2023).

2.4. Reakcijski parametri

Reakcijski parametri (koncentracija biljnog ekstrakta, koncentracija prekursora, pH vrijednost, temperatura, vrijeme) kao i vrsta biljnog ekstrakta i njegov kemijski sastav igraju veliku ulogu u fizikalno-kemijskim svojstvima sintetiziranih nanočestica (Ebrahiminezhad i sur., 2018).

Bioaktivne komponente biljnih ekstrakata s visokim antioksidacijskim djelovanjem posjeduju funkcionalne skupine koje reduciraju ione željeza u nanočestice željeza te su se sposobne vezati na samu površinu nanočestica čime postižu stabilizirajući učinak. Bitno je izabrati biljku koja ima veliku količinu antioksidativnih komponenti kako bi sinteza bila efikasnija, a prinos veći. Općenito, viša koncentracija bioaktivnih komponenti u ekstraktu koje imaju sposobnost reducirati željezo znači i bržu sintezu (Benković i sur., 2023). Prema istraživanjima, pri većim koncentracijama biljnog ekstrakta su nanočestice iz trokutastog oblika prešle u sferični (Shah i sur., 2015). Povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta se povećava i antioksidacijska aktivnost fenolnih tvari. Postupnim povećanjem koncentracije ekstrakta dolazi do sinteze nanočestica manje veličine (Fahmy i sur., 2018), no daljnjim povećavanjem koncentracije dolazi do aglomeracije zbog viška bioaktivnih molekula koje su prionule na površinu nanočestica i na njoj provele sekundarnu redukciju iona željeza

(Benković i sur., 2023; Ebrahiminezhad i sur., 2018)

Sol koja je korištena kao prekursor te koncentracija prekursora utječu na vrijeme sinteze te oblik i veličinu nanočestica. Istraživanjima je dokazano kako se smanjenjem koncentracije prekursora smanjuje i veličina čestica. Bitan je i omjer ekstrakt:prekursor, ako je prevelik, može doći do neželjene aglomeracije nanočestica (Benković i sur., 2023).

pH vrijednost ima veći utjecaj na veličinu čestica nego na njihov oblik (Iravani, 2011). No, treba uzeti u obzir kako se čestice pri istim pH vrijednostima mogu različito ponašati zbog različitog kemijskog sastava biljnog ekstrakta pomoću kojeg se sintetiziraju. Promjena pH vrijednosti dovodi do promjene naboja prirodnih fitokemikalija što utječe na sposobnost vezanja i redukcije metalnih iona tijekom sinteze nanočestica (Singh i sur., 2016). Nanočestice većih dimenzija nastaju pri nižim pH vrijednostima. Primjerice, pri pH 3 i 4 više je funkcijskih skupina dostupno za provođenje reakcija redukcije pa nastane više manjih nanočestica, dok je pri pH 2 dostupno manje funkcijskih skupina pa dolazi do agregacije čestica u veće strukture, tj. sinteze manje količine većih nanočestica (Shah i sur., 2015; Mohanpuria i sur., 2008).

Biosinteza se pokazala bržom na višim temperaturama, no mnoge bioaktivne komponente su termolabilne. Ako se temperatura poveća iznad 50°C doći će do inaktivacije biomolekula, primjerice denaturacije antioksidativnih komponenti kao što su aminokiseline te će sinteza biti sporija (Ebrahiminezhad i sur., 2018). Bitno je naglasiti da različiti biljni ekstrakti imaju različit kemijski sastav pa će prema tome drugačije podnositi temperature. Zbog hlapivosti bioaktivnih komponenti, sobna temperatura se pokazala sasvim dovoljnom za uspješnu sintezu nanočestica (Benković i sur., 2023). Povećanjem temperature se mogu sintetizirati sitnije nanočestice nego pri sobnoj što znači da je brzina reakcija i formacije nanočestica brža, ali prosječna veličina nastalih čestica se smanjuje (Shah i sur., 2015).

Vrijeme inkubacije je, također bitan čimbenik koji ima utjecaja kod biosinteze nanočestica. Što se sinteza duže provodi, veća je mogućnost da će doći do aglomeracije. Ako reakcijska smjesa dugo stoji, s vremenom može doći do nakupljanja nanočestica u veće aglomerate (Benković i sur., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

U ovom radu su korišteni osušeni listovi biljke melise (*Melissa officinalis*) od dobavljača Suban d.o.o. (Strmec Smoborski, Hrvatska) podrijetlom iz Srbije s godinom berbe 2023.

3.1.2. Pribor i aparatura

Pribor:

- staklene čaše od 25 mL i 600 mL
- plastična čaša od 250 mL
- menzura od 500 mL
- lijevak
- magnet
- magnetska mješalica
- stakleni štapić
- metalna špatula
- žličica
- stalak za epruvete
- staklene epruvete
- staklene pipete volumena 5 mL i 10 mL
- mikropipete volumena 100 μ L i 500 μ L
- odmjerna tikvica volumena 250 mL
- plastične kivete od 50 mL
- kiveta od kvarcnog stakla
- membranski filter (CHROMAFIL Xtra H-PTFE 45/25)

- štrcaljka od 10 mL
- filter papir
- reagens boca od tamnog stakla
- satna stakalca

Aparatura:

- analitička vaga TE214S-OCE (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- tehnička vaga (Tehničar Servag, Zagreb, Hrvatska)
- uljna kupelj IKA HBR 4 digital (IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- termometar (Iskra 0AT0611, Ljubljana, Slovenija)
- laboratorijski sušionik (Inko, ST605, Hrvatska)
- eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- pH metar (Jenco 601A, San Bernardino CA, SAD)
- vorteks (Biosan Vortex V-1 plus, Riga, Latvija)
- konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- UV-VIS spektrofotometar UV1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- FTIR spektrofotometar Spectrum one (Perkin Elmer, Waltham MA, SAD)
- svjetlosni mikroskop i kamera Motic B series (Motic Europe, Barcelona, Španjolska)
- uređaj za mjerenje hidrodinamičkog promjera Litesizer (Anton Paar, Graz, Austrija)
- kolorimetar PCE-CSM3 (PCE Instruments, Meschedeu, Njemačka)
- NIR spektrometar AvaSpec-NIR (Avantes, Apledoorn, Nizozemska)

3.1.3. Otapala i reagensi

- destilirana voda
- željezov (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) (Gram mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 20 %-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3) (Gram.mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, SAD)
- Etanol (96 %-tni) (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- metanol (CH_3OH) p.a. (J.T. Baker, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$)) p.a. (Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ekstrakta melise

Vodeni ekstrakt melise priprema se vaganjem 12 g usitnjenog biljnog materijala i miješanjem sa 360 mL destilirane vode u uljnoj kupelji IKA HBR 4 digital (IKA-Werk, Staufen, Njemačka) pri 80°C i 350 okretaja po minuti tijekom 30 minuta. Po završetku ekstrakcije ekstrakt se profiltrira te razrijedi do koncentracija koje su korištene u daljnjim eksperimentima: 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %.

3.2.2. Priprema otopine prekursora

Za otopinu prekursora se koristi 0,1 M otopina FeCl_3 u destiliranoj vodi. Navedena otopina pripremi se otapanjem FeCl_3 u destiliranoj vodi.

3.2.3. Sinteza nanočestica

Sinteza nanočestica željeza provodi se miješanjem biljnog ekstrakta s otopinom prekursora u omjeru 4:1, konkretno, 16 mL biljnog ekstrakta i 4 mL prekursora. Ubrzo nakon miješanja reakcijska smjesa mijenja boju iz svijetlo žute u tamno plavu/sivu što je indikator uspješne sinteze nanočestica.

3.2.4. Određivanje boje otopine

Određivanje boje otopine prije sinteze i nakon sinteze

Boja otopina određuje se prema Hunter-ovoj skali (L^* , a^* , b^* , Chroma i Hue) primjenom PCE-CSM3 kolorimetra (PCE Instruments, Meschedeu, Njemačka), uz prethodnu kalibraciju na bijelu ploču. Uzorak otopine ulije se u kivetu, smjesti na mjerno postolje i očitaju se vrijednosti boje dobivene nakon pritiska na tipku za početak mjerenja.

Određivanje boje dobivenog praha nanočestica željeza

Boja praha se, također, određuje prema Hunter-ovoj skali (L^* , a^* , b^* , Chroma i Hue) korištenjem kolorimetra PCE-CSM3 (PCE Instruments, Meschedeu, Njemačka) uz prethodnu kalibraciju na bijelu ploču.

3.2.5. Određivanje vodljivost

Električna vodljivost je sposobnost neke otopine da provodi električnu struju s mjernom jedinicom mikrosimens po centimetru ($\mu\text{S cm}^{-1}$). Vodljivost se određuje pomoću konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) uranjanjem sonde u otopine odmah nakon njihove pripreme.

3.2.6. Određivanje pH

pH je mjera kiselosti ili lužnatosti određenog medija. pH vrijednost otopina određuje se pomoću pH metra (Jenco 601A, San Bernardino CA, SAD) direktnim uranjanjem pH sonde u svježe pripremljene otopine.

3.2.7. Kontinuirani UV spektar

Kontinuirani UV spektar otopina snima kako bi se potvrdio nastanak Fe nanočestica. Spektar se snima na spektrofotometru UV1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan) u rasponu valnih duljina 200 – 800 nm i na spektrofotometru UV Biochrom Libra (S11, Cambridge, Engleska) na valnim duljinama 325 – 900 nm te se koristio program Acquire LITE (S11, Cambridge, Engleska). Uzorci su prije snimanja razrijeđeni 100 puta te su za svaki uzorak napravljena 3 mjerenja.

3.2.8. Određivanje hidrodinamičkog promjera metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti

Hidrodinamički promjer čestica određuje se pomoću uređaja Litesizer 500 (Anton Paar, Graz, Austrija) u otopinama razrijeđenima 100 puta. Za svaki uzorak se provode tri paralelna mjerenja.

3.2.9. FTIR (Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom)

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) je tehnika kojom je moguće identificirati funkcijske skupine zaslužne za sintezu i stabilizaciju nanočestica (Nkosinathi i sur., 2020), a snimana je uz suradnju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, na uređaju Spectrum one (Perkin Elmer, Waltham MA, SAD) u rasponu valnih brojeva $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$, uz prethodnu pripremu uzorka tabletiranjem sintetiziranog Fe praha s KBr soli u omjeru 1:100. Uzorci su snimani 4 puta.

3.2.10. NIR spektroskopija

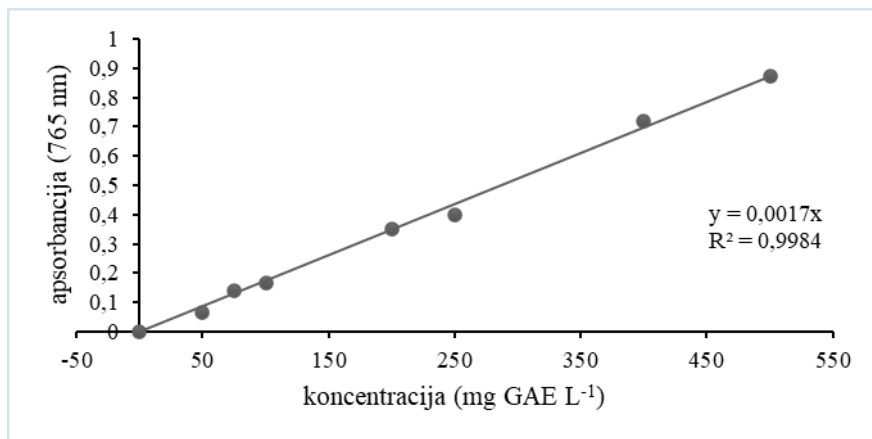
To je analitička metoda koja koristi blisko infracrveno zračenje koje pobuđuje ispitivani uzorak, a spektar koji se dobije je jedinstven za ispitivani uzorak. NIR spektroskopija je mjerena pomoću uređaja AvaSpec-NIR (Avantes, Apeldoorn, Nizozemska) uz korištenje programa AvaSoft 8.14 Full (Avantes, Apeldoorn, Nizozemska). Sonda se uranja u uzorak i provode se 3 paralelna mjerenja za svaki.

3.2.11. Kemijska analiza supernatanta i polaznog ekstrakta

Ukupni polifenoli

Polifenoli imaju antioksidativni učinak koji je moguće izmjeriti Folin-Ciocalteu metodom (Ebrahiminezhad i sur., 2018). U epruvetu se otpipetira 3,5 mL destilirane vode, 50 μL uzorka, 250 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 750 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 se pokreće reakcija te se uzorci ostave da odstoje 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon toga se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na 765 nm. Uz uzorke se pripremi i slijepa proba na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke, no umjesto uzorka se dodaje 100 μL destilirane vode. Uzorci koncentracija od 100 %, 75 % i 50 % su razrijeđeni 20 puta.

Za svaki uzorak se pripremaju dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (0 – 100 mg/L), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) L⁻¹ ili g⁻¹ uzorka.



Slika 2. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Jednadžba pravca za galnu kiselinu glasi:

$$y = 0,0017 * x$$

(1)

gdje je:

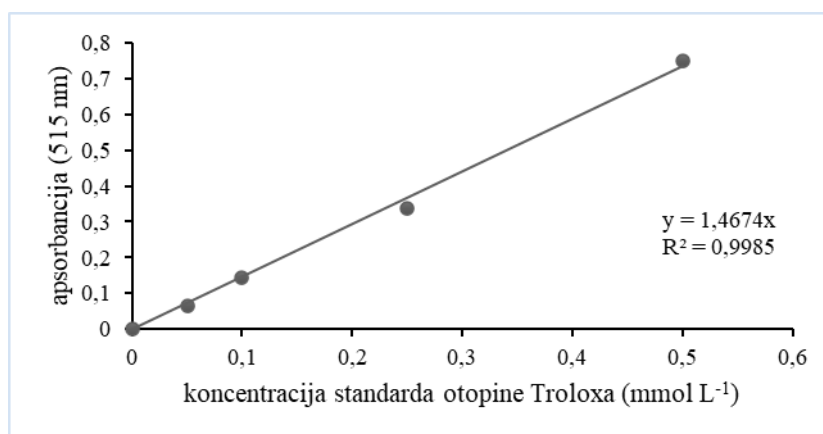
x – koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

y – apsorbanca na 765 nm

R² – koeficijent determinacije.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda se često koristi za određivanje antioksidativnog kapaciteta biljnih ekstrakata (Ebrahiminezhad i sur., 2018). Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U staklenu epruvetu se otpipetira 100 µL ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH nakon čega se dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku nakon čega se mjeri apsorbanca pri 515 nm u odnosu na slijepu probu koja umjesto uzorka sadrži istu količinu metanola. Prije mjerenja su uzorci koncentracija od 100 %, 75 % i 50 % razrijeđeni 20 puta.



Slika 3. Baždarni pravac za DPPH

Jednadžba pravca za DPPH glasi:

$$y = 1,4674 * x$$

(2)

gdje je:

x – koncentracija DPPH (mmol L⁻¹)

y – apsorbancija na 515 nm

R² – koeficijent determinacije.

3.2.12. Analiza svjetlosnim mikroskopom

Nanočestice željeza su promatrane i slikane svjetlosnim mikroskopom i kamerom Motic B series (Motic Europe, Barcelona, Španjolska).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Masa sintetiziranog praha

Tablica 1. Masa sintetiziranog praha

Koncentracija ekstrakta	Masa sintetiziranog praha (g)
2,5 %	0,0185 ± 0,0009
5 %	0,0252 ± 0,0012
10 %	0,0339 ± 0,0017
25 %	0,0501 ± 0,0025
50 %	0,0929 ± 0,0046
75 %	0,1368 ± 0,0068
100 %	0,1656 ± 0,0082

U tablici 1. su prikazane mase sintetiziranog praha nanočestica željeza dobivene korištenjem različitih koncentracija ekstrakta melise. Koncentracije ekstrakta koje su korištene su 2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % i 100 %. Vidljivo je kako je najmanja masa dobivena korištenjem najniže koncentracije biljnog ekstrakta. Povećanjem koncentracije se povećava i masa sintetiziranog nanopraha željeza, prema čemu je masa sintetiziranog praha proporcionalna koncentraciji biljnog ekstrakta. Navedeno se može objasniti činjenicom da koncentriraniji ekstrakt sadrži i veću količinu bioaktivnih spojeva koji se koriste u sintezi nanočestica te samim time veća količina reagensa daje i veću količinu produkta sintezom. Utjecaj koncentracije ekstrakta na količinu sintetiziranih nanočestica istraživali su Patil i Muthusamy, (2017). U navedenom radu utvrđeno je da povećanjem koncentracije bioaktivnih spojeva pri konstantnoj koncentraciji prekursora u otopini raste i intenzitet spektralne apsorpcije koji je direktno povezan s količinom sintetiziranih nanočestica, te isto tako i veličina sintetiziranih nanočestica – više koncentracije ekstrakta daju čestice manjih dimenzija.

4.2. Određivanje boje otopine

Parametri boje otopina određeni prije i nakon sinteze nanočestica, te parametri boje dobivenog nanopraha nakon sušenja prikazani su u tablicama 2 – 4.

Tablica 2. Boje otopina ekstrakta prije sinteze nanočestica željeza

Koncentracija ekstrakta	Boja otopina				
	L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue
2,5 %	47,89 ± 2,395	9,45 ± 0,473	6,61 ± 0,331	11,53 ± 0,578	34,94 ± 1,747
5 %	44,80 ± 2,240	8,61 ± 0,431	5,48 ± 0,274	10,21 ± 0,511	32,49 ± 1,625
10 %	42,84 ± 2,142	8,00 ± 0,400	5,80 ± 0,290	9,88 ± 0,494	35,95 ± 1,798
25 %	41,94 ± 2,097	8,60 ± 0,430	6,52 ± 0,326	10,80 ± 0,540	37,17 ± 1,859
50 %	38,28 ± 1,914	7,16 ± 0,358	3,19 ± 0,358	7,84 ± 0,392	24,02 ± 1,201
75 %	37,28 ± 1,864	6,07 ± 0,304	1,70 ± 0,304	6,30 ± 0,315	15,65 ± 0,783
100 %	37,05 ± 1,853	6,49 ± 0,325	1,35 ± 0,325	6,63 ± 0,332	11,75 ± 0,588

Tablica 3. Boje reakcijske smjese ekstrakta i prekursora nakon sinteze nanočestica željeza

Koncentracija ekstrakta	Boja otopine				
	L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue
2,5 %	32,09 ± 1,605	7,57 ± 0,379	2,69 ± 0,135	8,04 ± 0,402	19,56 ± 0,978
5 %	32,09 ± 1,605	7,85 ± 0,393	2,41 ± 0,121	7,96 ± 0,398	17,63 ± 0,882
10 %	29,88 ± 1,494	5,84 ± 0,292	1,52 ± 0,176	6,04 ± 0,302	14,58 ± 0,729
25 %	31,51 ± 1,576	6,53 ± 0,327	2,26 ± 0,113	6,91 ± 0,346	19,05 ± 0,953
50 %	30,66 ± 1,533	6,40 ± 0,320	1,81 ± 0,091	6,66 ± 0,333	15,82 ± 0,791
75 %	30,93 ± 1,547	6,27 ± 0,314	2,03 ± 0,102	6,59 ± 0,330	17,96 ± 0,898
100 %	31,68 ± 1,584	6,41 ± 0,321	2,33 ± 0,117	6,82 ± 0,341	19,92 ± 0,996

Tablica 4. Boje sintetiziranog praha nanočestica željeza nakon sušenja

Koncentracija ekstrakta	Boja praha				
	L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue
2,5 %	$30,38 \pm 1,519$	$1,73 \pm 0,087$	$1,95 \pm 0,098$	$2,60 \pm 0,130$	$48,39 \pm 2,420$
5 %	$30,65 \pm 1,533$	$1,50 \pm 0,075$	$2,00 \pm 0,100$	$2,50 \pm 0,125$	$53,14 \pm 2,657$
10 %	$28,49 \pm 1,425$	$0,51 \pm 0,026$	$1,24 \pm 0,062$	$1,34 \pm 0,067$	$67,52 \pm 3,376$
25 %	$26,41 \pm 1,321$	$-0,13 \pm 0,007$	$-1,02 \pm 0,051$	$1,03 \pm 0,052$	$262,76 \pm 13,198$
50 %	$29,17 \pm 1,459$	$0,09 \pm 0,005$	$-0,32 \pm 0,016$	$0,34 \pm 0,017$	$285,97 \pm 14,299$
75 %	$26,91 \pm 1,346$	$0,22 \pm 0,011$	$-0,07 \pm 0,004$	$0,23 \pm 0,012$	$343,47 \pm 17,174$
100 %	$27,18 \pm 1,359$	$0,40 \pm 0,020$	$-0,05 \pm 0,006$	$0,41 \pm 0,021$	$352,62 \pm 17,631$

Kolorimetrija omogućuje vizualno uspoređivanje jakosti boja uzoraka poznate i nepoznate koncentracije. Za utvrđivanje boje je korišten CIE L^*a^*b i CIE L^*C^*h prostor boja zasnovan na suprotnoj teoriji boja. Funkcija svjetline L^* daje skalu neutralne boje od crne do bijele u rasponu od 0 do 100 jedinica, vrijednosti od 0 do 50 pokazuju tamnu boju, dok vrijednosti od 51 do 100 pokazuju svijetlu. Funkcija a^* naznačuje crvenu ili zelenu boju, a b^* naznačuje žutu ili plavu. Hue vrijednost pokazuje tonalnost, tj. nijansu ili kut boje, a Chroma kromatičnost, tj. zasićenje (Mihoci, 2015). U tablicama 2, 3 i 4 su prikazani podaci izmjereni prije sinteze i nakon sinteze nanočestica, te boje osušenih nanočestica. L^* vrijednosti izmjerene za ekstrakte prije sinteze kreću se u rasponu od $37,05 \pm 1,853$ (100 % ekstrakt) do $47,89 \pm 2,395$ (2,5 % ekstrakt); za reakcijske smjese od $29,88 \pm 1,494$ (10 % smjesa) do $32,09 \pm 1,605$ (2,5 % smjesa) te od $26,41 \pm 1,321$ (Fe nanoprah sintetiziran od 25 % ekstrakta) do $30,65 \pm 1,533$ (Fe nanoprah sintetiziran od 5 % ekstrakta) (Tablica 2, 3 i 4). U pravilu, L^* vrijednost kod svih mjerenja pada s povećanjem koncentracije, a vrijednosti ne prelaze 50 što pokazuje tamnu boju. Što je viša koncentracija biljnog ekstrakta to je nastalo više nanočestica te je detektirano više čestica tamne boje (Tablica 3). a^* vrijednosti kreću se u rasponu od $6,07 \pm 0,304$ (75 % ekstrakt) do $9,45 \pm 0,473$ (2,5 % ekstrakt) za ekstrakte prije sinteze; za reakcijske smjese su vrijednosti u rasponu od $5,84 \pm 0,292$ (10 % smjesa) do $7,85 \pm 0,393$ (5 % smjesa) te od $-0,13 \pm 0,007$ (Fe nanoprah sintetiziran od 25 % ekstrakta) do $1,73 \pm 0,087$ (Fe nanoprah sintetiziran od 2,5 % ekstrakta) (Tablica 2, 3 i 4). a^* vrijednost

povećanjem koncentracije, također, u sva tri slučaja padaju, te su vrijednosti pozitivne što ukazuje na crvenu boju s izuzetkom sušenih nanočestica dobivenih 25 %-tnim ekstraktom čija je vrijednost negativna te naznačuje prijelaz iz crvene u zelenu boju (Tablica 4). Izmjerene b^* vrijednost za ekstrakt se kreću od $1,35 \pm 0,325$ (100 % ekstrakt) do $6,61 \pm 0,331$ (2,5 % ekstrakt). Za reakcijske smjese se vrijednosti kreću u rasponu od $1,52 \pm 0,176$ (10 % smjesa) do $2,69 \pm 0,135$ (2,5 % smjesa) te od $-1,02 \pm 0,051$ (Fe nanoprah dobiven od 25 % ekstrakta) do $2,00 \pm 0,1$ (Fe nanoprah dobiven od 5 % ekstrakta) za sušeni nanoprah željeza (Tablica 2 i 3). Kod osušenih nanočestica dobivenih iz 25 %, 50 %, 75 % i 100 % je izmjerena vrijednost negativna što pokazuje prelazak iz žute u plavu boju, vjerojatno zbog nastanka aglomerata nanočestica (Tablica 4). Vrijednosti zasićenja (Chroma) se za čisti ekstrakt kreću od $6,30 \pm 0,315$ (75 % ekstrakt) do $11,53 \pm 0,578$ (2,5 % ekstrakt); za reakcijske smjese su rasponi od $6,04 \pm 0,302$ (10 % smjesa) do $8,04 \pm 0,402$ (2,5 % smjesa) te od $0,23 \pm 0,012$ (Fe nanoprah od 75 % ekstrakta) do $2,60 \pm 0,13$ (Fe nanoprah od 2,5 % ekstrakta) za sintetizirani nanoprah (Tablica 2, 3 i 4). Vrijednosti zasićenja Chroma padaju povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta, što znači da i reakcijska smjesa i suhi prah prelaze prema tamnijoj boji s manjim zasićenjem i intenzitetom. Prema mjerenjima, nijanse boje (Hue) za ekstrakt prije sinteze se kreću od vrijednosti $11,75 \pm 0,588$ (100 % ekstrakt) do vrijednosti $37,17 \pm 1,859$ (25 % ekstrakt) (Tablica 2). Za reakcijske smjese je taj raspon od $14,58 \pm 0,729$ (10 % smjesa) do $19,92 \pm 0,996$ (100 % smjesa) (Tablica 3). Raspon za nijansu boje (Hue) nanočestica željeza je $48,39 \pm 2,420$ (Fe nanoprah od 2,5 % ekstrakta) do $352,62 \pm 17,631$ (Fe nanoprah od 100 % ekstrakta) (Tablica 4). Nijansa boje (Hue) kod suhih nanočestica raste kod koncentracija 25 %, 50 %, 75 % i 100 % što je rezultat prijelaza b^* vrijednosti u negativnu domenu, čime i sama nijansa, tj. kut prelazi iz prvog kvadranta ($0 - 90$) u četvrti ($270 - 360^\circ$) (Tablica 4).

4.3. Određivanje vodljivosti prije sinteze i nakon sinteze nanočestica

Tablica 5. Vodljivost izmjerena prije sinteze nanočestica i nakon sinteze nanočestica

Koncentracija ekstrakta	Vodljivost (mS cm ⁻¹)	
	prije sinteze	nakon sinteze
2,5 %	0,2473 ± 0,012	7,545 ± 0,377
5 %	0,3187 ± 0,016	7,700 ± 0,385
10 %	0,4936 ± 0,025	8,141 ± 0,407
25 %	0,9607 ± 0,048	9,410 ± 0,471
50 %	1,6200 ± 0,081	10,180 ± 0,509
75 %	2,2810 ± 0,114	9,651 ± 0,483
100 %	2,9160 ± 0,146	9,170 ± 0,459

Prema mjerenjima, čiji se raspon kreće od $0,2473 \pm 0,012 \text{ mS cm}^{-1}$ (2,5 % ekstrakt) do $2,9160 \pm 0,146 \text{ mS cm}^{-1}$ (100 % ekstrakt), je vidljivo kako vodljivost otopine ekstrakta prije sinteze raste povećanjem koncentracije otopine ekstrakta (Tablica 5). Nakon što je otopina ekstrakta pomiješana s otopinom prekursora, tj. nakon sinteze nanočestica, iznos vodljivosti je porastao u odnosu na sami ekstrakt. Za taj porast su zaslužna svojstva vodljivosti nanočestica željeza koje su sintetizirane. Vrijednosti se kreću od $7,545 \pm 0,377 \text{ mS cm}^{-1}$ (2,5 % ekstrakt) do $10,180 \pm 0,509 \text{ mS cm}^{-1}$ (50 % ekstrakt). Vodljivost se povećava povećanjem koncentracije do 50 %-tnog biljnog ekstrakta gdje doseže maksimum te nakon toga vrijednost blago pada (Tablica 5).

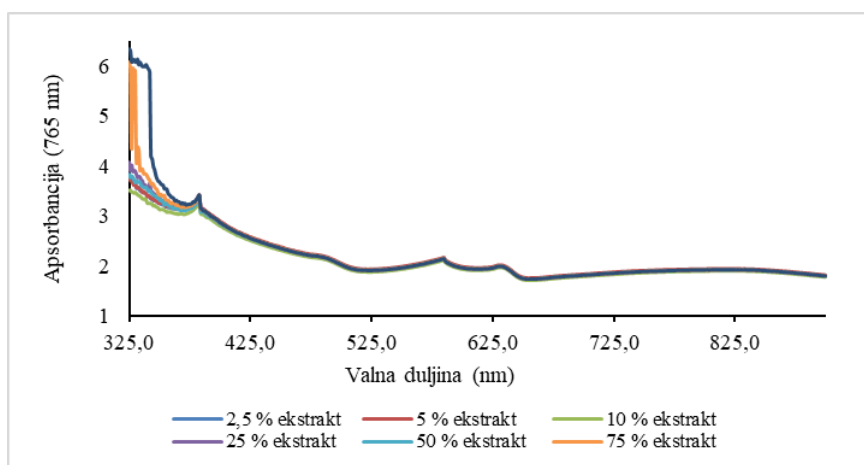
4.4. Određivanje pH

Tablica 6. Određivanje pH vrijednosti prije sinteze i nakon sinteze nanočestica

Koncentracija ekstrakta	pH	
	prije sinteze	nakon sinteze
2,5 %	5,73 ± 0,287	2,28 ± 0,114
5 %	5,79 ± 0,290	2,29 ± 0,115
10 %	5,77 ± 0,290	2,22 ± 0,111
25 %	5,87 ± 0,293	2,06 ± 0,103
50 %	5,85 ± 0,292	2,05 ± 0,103
75 %	5,80 ± 0,290	2,14 ± 0,107
100 %	5,83 ± 0,292	2,30 ± 0,115

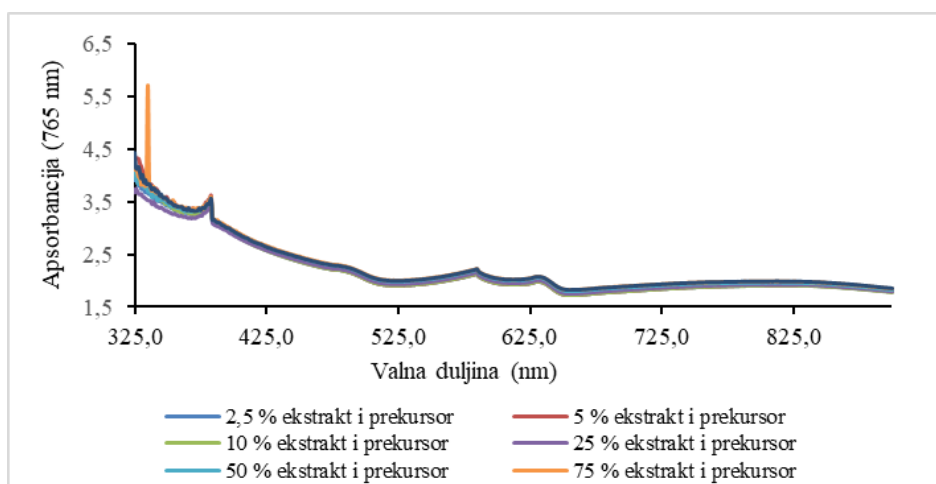
pH biljnog ekstrakta je blago kiseo što pokazuje raspon vrijednosti od $5,73 \pm 0,287$ (2,5 % ekstrakt) do $5,87 \pm 0,290$ (25 % ekstrakt) (Tablica 6). pH nakon sinteze se naglo smanjuje jer je u otopine biljnog ekstrakta dodana vrlo kisela otopina prekursora čija je pH vrijednost 2, a vrijednosti sežu od $2,05 \pm 0,103$ (50 % ekstrakt) do $2,30 \pm 0,115$ (100 % ekstrakt) (Tablica 6). Kako pH ima utjecaj na veličinu čestica, pri ovako niskim vrijednostima sinteze dostupna je manja količina funkcijskih skupina za provođenje reakcija redukcije zbog čega dolazi do agregacije čestica u veće nakupine (Shah i sur., 2015) što je potkrijepljeno rezultatima mjerenja boje nastalih osušenih nanočestica.

4.5. Kontinuirani UV spektar



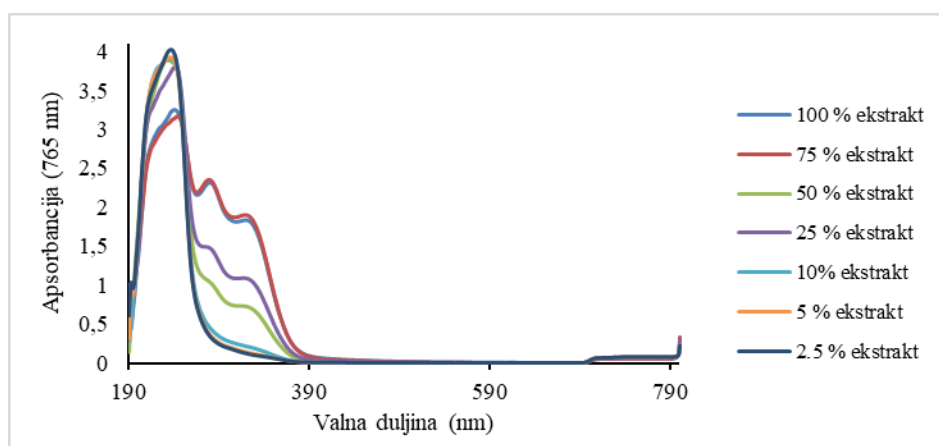
Slika 4. Prikaz kontinuiranog UV spektra za čisti biljni ekstrakt melise različitih koncentracija (2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) u mjernom području od 325 nm do 800 nm.

Napravljena su tri paralelna mjerenja za svaki uzorak te je za izradu grafova uzeta srednja vrijednost. UV – VIS spektrofotometer (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska) koji je korišten za mjerenje (slika 4, slika 5) ima mjerno područje u rasponu od 325 nm do 900 nm. Intenziteti apsorbancije prikazani na slici 4 se preklapaju za sve koncentracije biljnog ekstrakta melise.



Slika 5. Prikaz kontinuiranog UV spektra za reakcijske smjese otopina ekstrakta meliserazličitih koncentracija (2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) i dodanog prekursora u mjernom području od 325 nm do 800 nm.

Sintetizirane nanočestice željeza pokazuju kontinuiranu apsorpciju u vidljivom spektru (slika 5). Tijekom UV – vis analize, intenzitet apsorpcije se povećao s povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta nakon sinteze (slika 5) u usporedbi s prikazom spektra prije sinteze (slika 4) (plava linija koja pokazuje 100 %-tnu smjesu je pri višoj apsorpciji od ostalih reakcijskih smjesa s nižim koncentracijama). To se dogodilo jer su na površine sintetiziranih čestica vezane određene funkcionalne skupine iz fitokemikalija koje pružaju stabilizacijski učinak što potvrđuje Mohamad i sur., (2014). Međutim, na prikazanom spektru raspona valnih duljina od 325 nm do 800 nm (slika 5), sintetizirane nanočestice nisu pokazale nikakve očite pikove što u svom radu prikazuju i Alfredo Reyes Villegas i sur., (2020).

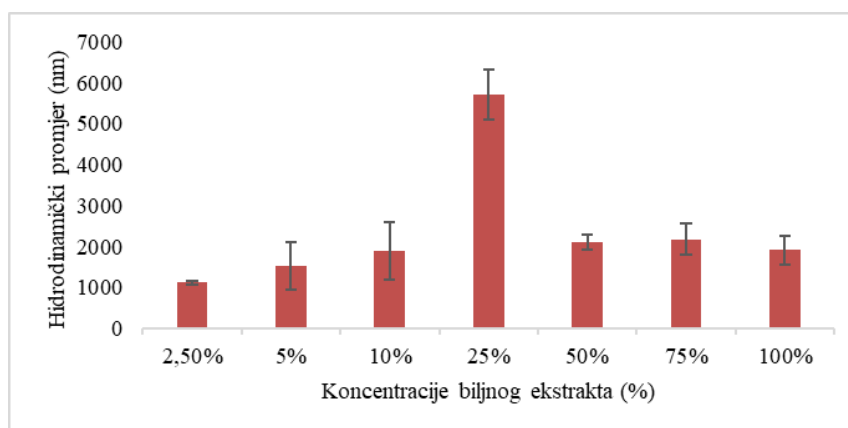


Slika 6. Kontinuirani UV spektri reakcijskih smjesa proizvedenih sa ekstraktima melise različitih koncentracija (2,5 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) u mjernom području od 200 nm do 800 nm

Kako bi se potvrdilo postojanje različitih vrsta Fe nanočestica, snimljeni su i spektri u širem valnom području, od 200 nm do 800 nm. Prikaz predstavlja pikove spojeva karakterističnih za biljku melisu (slika 6). Na valnoj duljini 280 nm je uočljiv pik karakterističan za ružmarinsku kiselinu kojom melisa obiluje te specifični pik željeza na 325 nm što dokazuje nastanak nanočestica što je potvrđeno i u istraživanjima temeljenima na zelenoj sintezi i karakterizaciji nanočestica željeza autora Alshehri i sur. (2017) te Badma Priya i sur. (2017). U rasponu valnih duljina od 220 nm do 240 nm je pik specifičan za benzoilnu skupinu prisutnu u flavonoidima što potvrđuje i istraživanje o biosintezi potpomognutoj melisom Bordbara i sur., (2018). Također, iz kontinuiranog UV spektra vidljivo je smanjenje pika pri valnoj duljini 340 – 350 nm, što ukazuje na trošenje bioaktivnih spojeva na sintezu

nanočestica. Navedeni pik karakterističan je za flavonoide koji djeluju kao fito reducensi u reakcijama sinteze nanočestica (Taniguchi i sur., 2023; Marslin i sur., 2018).

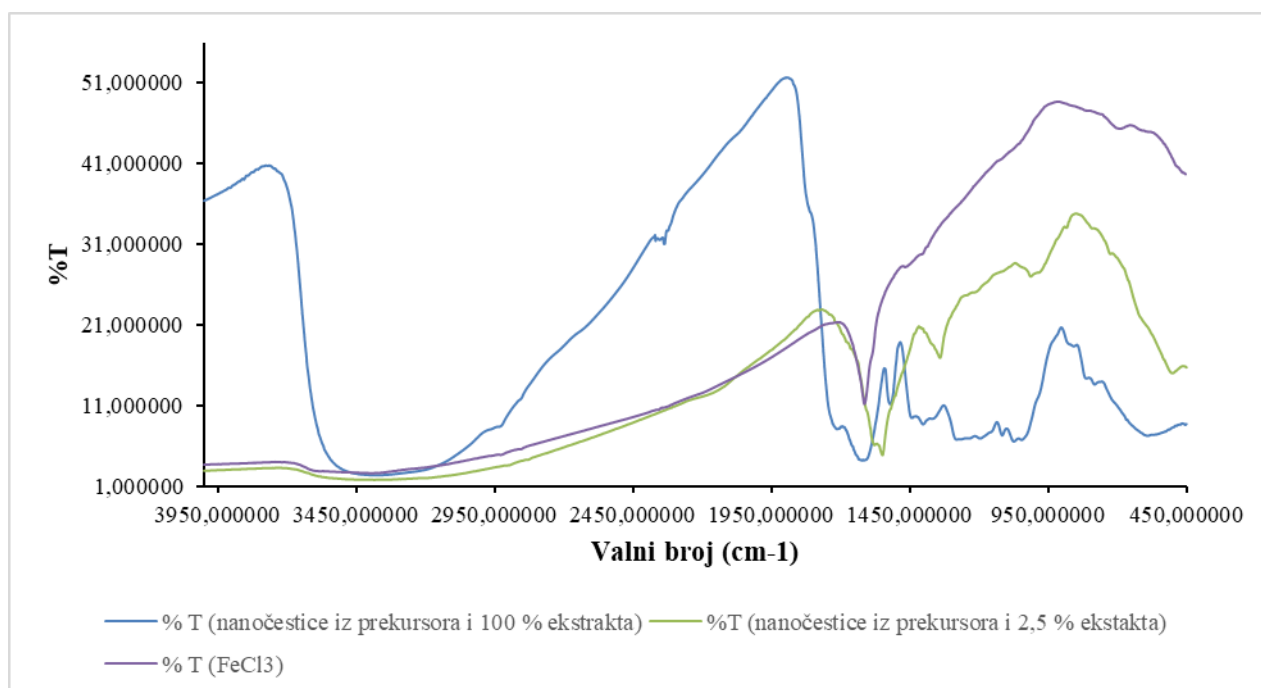
4.6. Određivanje hidrodinamičkog promjera metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS)



Slika 7. Prikaz hidrodinamičkog promjera nanočestica željeza u biljnim ekstraktima različitih koncentracija

DLS je tehnika korištena za mjerenje raspodjele čestica s obzirom na njihovu veličinu u nekoj suspenziji, a temeljena je na Brownovom gibanju (Madhavi, 2013). Raspon veličina hidrodinamičkog promjera nanočestica se kreće od $1120,47 \pm 43,28$ nm (Fe nanočestice od 2,5 % ekstrakta) do $5722,91 \pm 616,16$ nm (Fe nanočestice od 25 % ekstrakta). Stupčastim dijagramom (slika 7) je predloženo kako su čestice najvećeg hidrodinamičkog promjera sintetizirane u 25 %-tnoj otopini biljnog ekstrakta. Najmanji su promjer imale nanočestice iz najrazrjeđenijeg biljnog ekstrakta (2,5 %), dok se kod ostalih koncentracija može uočiti raspon veličina od 1500 nm do 2180 nm. Na slici je također vidljivo da su veličine sintetiziranih nanočestica ovisne o koncentraciji ekstrakta, te da se navedene veličine dosežu najviše vrijednosti pri 25 % ekstraktu te padaju prema većoj koncentraciji ekstrakta. Patil i Muthusamy (2017) utvrdili su da povećanjem koncentracije bioaktivnih spojeva pri konstantnoj koncentraciji prekursora u otopini opada veličina sintetiziranih nanočestica.

4.7. FTIR (Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom)

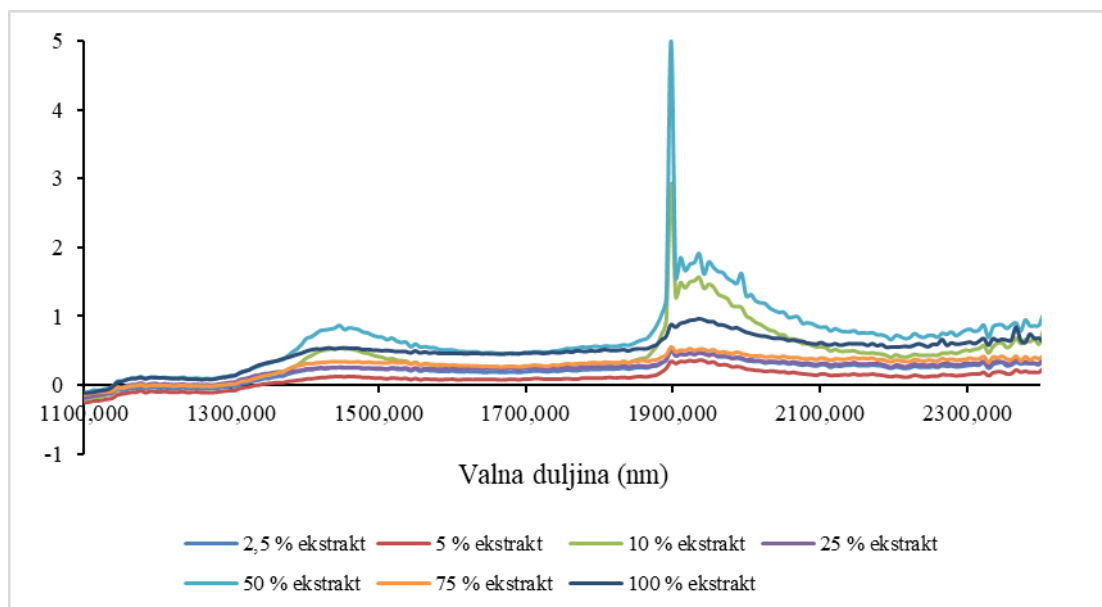


Slika 8. FTIR spektr nanočestica sintetiziranih iz otopine prekursora i 2,5 %-tnog ekstrakta (zeleno); nanočestice sintetizirane iz otopine prekursora i 100 %-tnog ekstrakta (plavo) te čiste soli prekursora FeCl_3 (ljubičasto)

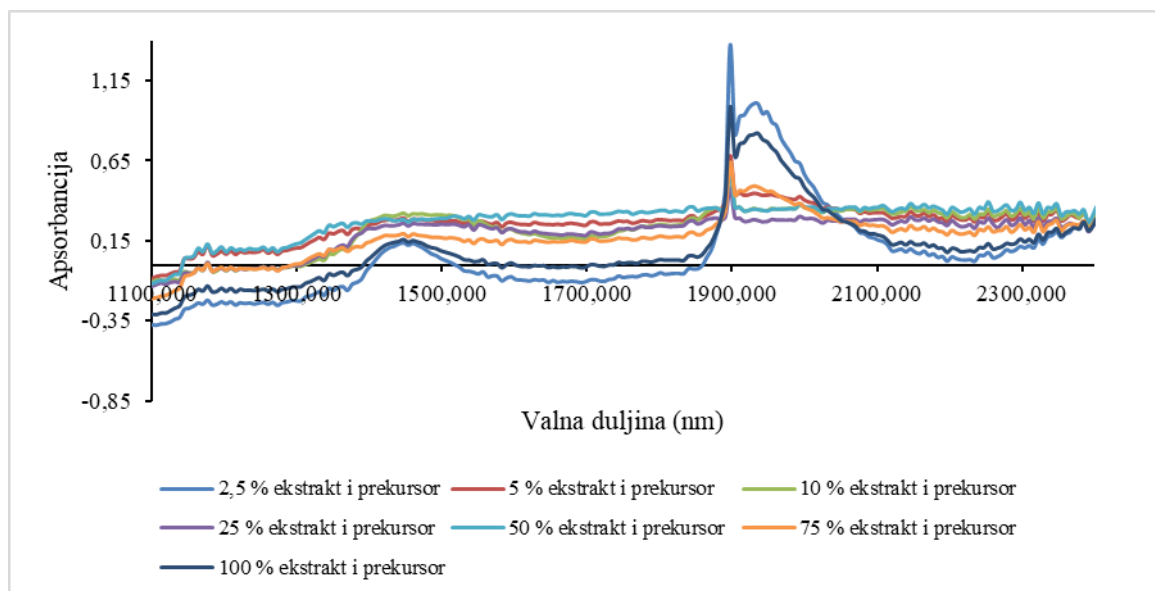
FTIR spektroskopijom je moguće utvrditi koji spojevi djeluju kao stabilizatori nastalih nanočestica željeza. Na slici 8 su prikazani spektri nanočestica sintetiziranih iz otopine prekursora iz 2,5 %-tnog ekstrakta, nanočestice sintetizirane iz otopine prekursora 100 %-tnog ekstrakta i čiste soli prekursora željezovog klorida. Na sva tri spektra (slika 8) je vidljiv široki pik karakterističan za vodu pri rasponu vrijednosti od 3500 cm^{-1} do 3100 cm^{-1} , pikovi pri 1610 cm^{-1} i 1437 cm^{-1} predstavljaju karboksilne skupine fenola prisutnih u biljnom ekstraktu. Na spektrima nanočestica sintetiziranih iz biljnih ekstrakata pik pri vrijednosti 1020 cm^{-1} može predstavljati C-O-C vezu ili rastezanje C-O prisutno u flavonoidima te pri 1260 cm^{-1} je pik specifičan za karbonilnu skupinu. Pik na spektrima nanočestica sintetiziranih iz 100 % biljnog ekstrakta kod vrijednosti 1608 cm^{-1} i koncentracije 2,5 % kod vrijednosti 1550 cm^{-1} se može pripisati vibracijama aromatske C=C skupine. Također, vidljivo na sva tri spektra pri rasponu vrijednosti $500\text{-}580\text{ cm}^{-1}$ je pik karakterističan za željezo prisutno u prekursoru te u biljnim ekstraktima pomoću kojih su nanočestice željeza sintetizirane. Također je vidljivo da je taj pik puno izraženiji u slučaju nanočestica sintetiziranih pomoću

100 %-tne otopine ekstrakta. Dobiveni rezultati se mogu potvrditi usporedbom s istraživanjima Bordbara i sur., (2018) u istraživanju zelene sinteze potpomognute biljnim ekstraktom melise te Alija i sur., (2016) koji su provodili sintezu i karakterizaciju nanočestica oksida željeza.

4.8. NIR spektroskopija



Slika 9. NIR spektar različitih koncentracija biljnog ekstrakta melise



Slika 10. NIR spektar različitih koncentracija ekstrakta s dodanim prekursorom

Infracrvenom spektroskopijom u bliskom području je moguće odrediti kemijski sastav te kvantificirati sadržaj bioaktivnih komponenti u nekom sustavu (Beć i sur., 2021). Međutim, na spektar utječu fizikalna svojstva kao što su veličina čestica, kristalna struktura čestica te voda u kojoj su čestice suspendirane (Gaub i sur., 2004). Pikovi prisutni pri valnoj duljini 1450 nm i 1940 nm su apsorpcijski maksimumi vode. Porast visine apsorpcijskih maksimuma od manje valne duljine prema većoj prikazano na slici 10 u usporedbi sa slikom 9 ukazuje na promjenu valentnog naboja, tj. nastanak oksida željeza. Isto je dokazano i u radu Bhagwata i sur., (2007). Međutim, u spektrima nije vidljiva pravilna promjena s obzirom na koncentraciju ekstrakta.

4.9. Kemijska analiza supernatanta i polaznog ekstrakta

4.9.1. Ukupni polifenoli

Tablica 7. Prikaz koncentracija ukupnih polifenola u čistom ekstraktu i polifenola nakon sinteze nanočestica željeza

Koncentracija ekstrakta	Koncentracija polifenola u čistom ekstraktu (mg GAE L ⁻¹)	Koncentracija polifenola u mješavini ekstrakta i prekursora (mg GAE L ⁻¹)	Utrošeni polifenoli (mg GAE L ⁻¹)
2,5 %	75,8824 ± 2,2765	52,3539 ± 1,5706	23,5294 ± 0,7059
5 %	118,8245 ± 3,3567	73,5294 ± 2,2059	45,2941 ± 1,3588
10 %	205,8824 ± 6,1765	74,7059 ± 2,2412	131,1765 ± 3,9353
25 %	407,9412 ± 12,2382	159,7059 ± 4,7912	248,2353 ± 7,4471
50 %	1441,1765 ± 43,2353	505,8824 ± 15,1765	935,2941 ± 28,0588
75 %	1635,2941 ± 49,0588	517,6471 ± 15,5294	1117,6470 ± 33,5294
100 %	2129,4118 ± 63,8824	658,8235 ± 19,7647	1470,5880 ± 44,1177

Folin-Ciocalteu metodom se mogu utvrditi fenolni spojevi, ali i ostali spojevi koji imaju redukcijsku sposobnost kao što su aminokiseline, ugljikohidrati, organske kiseline i dr. Intenzitet plave boje, mjeren spektrofotometrom, koja se razvije je direktno proporcionalan ukupnoj količini polifenola prisutnih u biljnom ekstraktu. Ukupni udio polifenola se računa

uz pomoć baždarnе krivulje galne kiseline korištene kao standard (Mohamad i sur., 2014). Ukupni udio polifenola u čistom biljnom ekstraktu melise, prikazan u tablici 7, je vrlo visok čime se melisa pokazuje kao odličan izvor reducirajućih tvari za sintezu nanočestica što potvrđuje istraživanje Ziagova i sur., (2022) te Sentkowska i sur., (2015) koji su utvrđivali ukupni sadržaj polifenola u biljnom ekstraktu melise. Razrjeđenjem otopine biljnog ekstrakta se taj udio smanjuje. Raspon koncentracija za čisti ekstrakt seže od $75,8824 \pm 2,2765$ mg GAE L⁻¹ (2,5 % ekstrakt) do $2129,4118 \pm 63,8824$ mg GAE L⁻¹ (100 % ekstrakt), a za reakcijsku smjesu su ti rasponi od $52,3539 \pm 1,5706$ mg GAE L⁻¹ do $658,8235 \pm 19,7647$ mg GAE L⁻¹ (tablica 7). Nakon miješanja otopine prekursora s biljnim ekstraktom je vidljiv značajan utrošak polifenola kao sredstva za sintezu nanočestica. Najveći utrošak polifenola je pri najvišoj koncentraciji zbog vrlo visoke količine polifenolnih spojeva u 100 %-tnom ekstraktom prema čemu je nastala i najveća količina nanočestica. Raspon koncentracija utrošenih polifenola je od $23,5294 \pm 0,7059$ mg GAE L⁻¹ (za sintezu Fe nanočestica iz 2,5 % ekstrakta) do $1470,588 \pm 44,1177$ mg GAE L⁻¹ (za sintezu Fe nanočestica iz 100 % ekstrakta) (tablica 7).

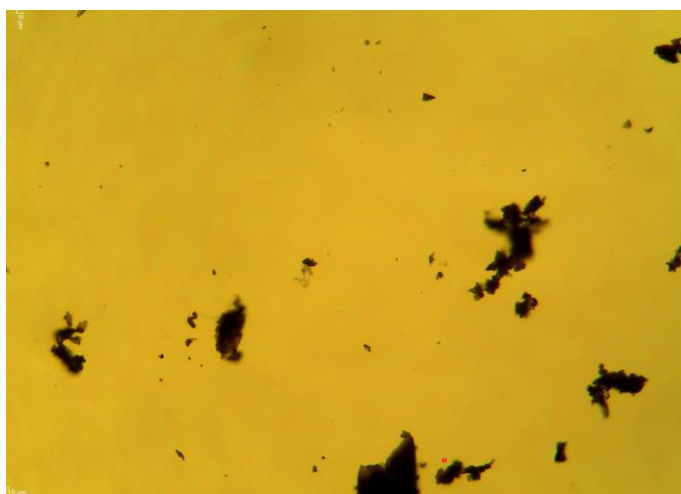
4.9.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Tablica 8. DPPH utrošen za sintezu nanočestica željeza

Koncentracija ekstrakta	Stvarna koncentracija ekstrakta (mmol L ⁻¹)	Stvarna koncentracija smjese ekstrakta i prekursora (mmol L ⁻¹)	DPPH utrošen za sintezu (mmol L ⁻¹)
2,5 %	$0,4729 \pm 0,0236$	$0,2699 \pm 0,0135$	$0,2031 \pm 0,0102$
5 %	$1,0278 \pm 0,0514$	$0,4000 \pm 0,0200$	$0,6278 \pm 0,0314$
10 %	$1,4517 \pm 0,0726$	$0,5827 \pm 0,0291$	$0,8691 \pm 0,0435$
25 %	$5,4418 \pm 0,2701$	$1,3323 \pm 0,0666$	$4,1095 \pm 0,2055$
50 %	$6,6901 \pm 0,4845$	$3,6391 \pm 0,1820$	$6,0510 \pm 0,3025$
75 %	$16,8507 \pm 0,8425$	$4,3478 \pm 0,2174$	$12,5029 \pm 0,6251$
100 %	$19,3267 \pm 0,9663$	$5,3564 \pm 0,2678$	$13,9703 \pm 0,6985$

DPPH spektrofotometrijska metoda omogućuje procjenu antioksidativne aktivnosti bioaktivnih spojeva iz ekstrakata ili drugih bioloških izvora (Koksal i sur., 2011). Stvarna koncentracija ekstrakta za obilježavaju vrijednosti od $0,4729 \pm 0,0236 \text{ mmol L}^{-1}$ (za 2,5 % ekstrakt) do $19,3267 \pm 0,9663 \text{ mmol L}^{-1}$ (za 100 % ekstrakt) dok su vrijednosti za reakcijsku smjesu ekstrakta i prekursora u rasponu od $0,2699 \pm 0,0135 \text{ mmol L}^{-1}$ (za 2,5 % smjesu) do $5,3564 \pm 0,2678 \text{ mmol L}^{-1}$ (za 100 % smjesu). Raspon vrijednosti utrošenog DPPH-a je u granicama od $0,2031 \pm 0,0102 \text{ mmol L}^{-1}$ (za 2,5 % ekstrakt) do $13,9703 \pm 0,6985 \text{ mmol L}^{-1}$ (za 100 % ekstrakt). Rezultati mjerenja su sukladni rezultatima Ziagova i sur., (2022) te Koksal i sur., (2011) koji su u svojem istraživanju utvrđivali antioksidacijsku aktivnost biljnog ekstrakta matičnjaka DPPH metodom. U tablici 8 vidljivo je kako je najmanje DPPH utrošeno za sintezu nanočestica željeza u najrazrjeđenijem biljnom ekstraktu, prema tome, antioksidacijska aktivnost je bila najmanja pri najmanjoj koncentraciji. S povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta antioksidacijska aktivnost raste.

4.10. Mikroskopska slika nanočestica



Slika 11. Nakupine nanočestica željeza

Nanočestice koje su nastale su uglavnom nepravilnog oblika (slika 11). Međutim, bitno je naglasiti da je na snimci svjetlosnim mikroskopom jasno vidljivo agregiranje čestica u veće nakupine, koje se događa nakon dužeg stajanja otopine ili pak nakon sušenja čestica, koje su, zbog svojih izrazito malih dimenzija, sklone stvaranju agregata. Nadalje, radi daljnje analize strukture samih nanočestica preporuča se u budućim istraživanjima snimiti čestice elektronskim mikroskopom, što u ovom istraživanju nije provedeno.

5.ZAKLJUČCI

1. Pri većoj koncentraciji biljnog ekstrakta je nastala veća masa nanočestica. Masa sintetiziranog praha je proporcionalna koncentraciji biljnog ekstrakta.
2. Kolorimetrijom je utvrđeno kako su nastale nanočestice tamne boje ($L^* < 50$). Kod reakcijskih smjesa i suhih nanočestica vidljiv je prelazak boje iz žutog u plavo područje (b^*).
3. Vodljivost reakcijskih smjesa raste nakon sinteze zbog svojstva vodljivosti nanočestica željeza.
4. Kontinuiranom UV-Vis i FTIR spektroskopijom je potvrđen nastanak nanočestica željeza.
5. Utrošak bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem i polifenola na sintezu nanočestica željeza raste s porastom koncentracije ekstrakta. Infracrvenim spektrom u bliskom području je prikazan porast apsorpcijskih maksimuma od manje valne duljine prema većoj što potvrđuje nastanak oksida željeza.
6. Utvrđeno je kako u biljnom ekstraktu melise ima velika količina polifenola, tj. tvari s reducirajućom sposobnošću. Razrjeđenjem otopine ekstrakta se taj udio smanjuje, a najveći utrošak polifenola je bio pri najvišoj koncentraciji.

6. POPIS LITERATURE

- Abegunde, S. M., Idowu, K. S., & Sulaimon, A. O. (2020). Plant-Mediated Iron Nanoparticles and their Applications as Adsorbents for Water Treatment—A Review. *Journal of Chemical Reviews*, 2(2), 103–113. <https://doi.org/10.33945/sami/jcr.2020.2.3>
- Alfredo Reyes Villegas, V., Isaías De León Ramírez, J., Hernandez Guevara, E., Perez Sicairos, S., Angelica Hurtado Ayala, L., & Landeros Sanchez, B. (2020). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles for photocatalysis of nitrobenzene. *Journal of Saudi Chemical Society*, 24(2), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.12.004>
- Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., & Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9, 49–67. <https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>
- Alshehri, A., Malik, M. A., Khan, Z., Al-Thabaiti, S. A., & Hasan, N. (2017). Biofabrication of Fe nanoparticles in aqueous extract of Hibiscus sabdariffa with enhanced photocatalytic activities. *RSC Advances*, 7(40), 25149–25159. <https://doi.org/10.1039/c7ra01251a>
- Badma Priya, D., Thirumalai, D., & Asharani, I. V. (2017). Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Mediated by Actinodaphne madraspatna Bedd Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 29(11), 2446–2448.
- Badmus, K. O., Coetsee-Hugo, E., Swart, H., & Petrik, L. (2018). Synthesis and characterisation of stable and efficient nano zero valent iron. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23667–23684. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2119-7>
- Beć, K. B., Grabska, J., & Huck, C. W. (2021). NIR spectroscopy of natural medicines supported by novel instrumentation and methods for data analysis and interpretation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 193, 113686. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113686>
- 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>
- Bhagwat, S., Singh, H., Athawale, A., Hannover, B., Jouen, S., Lefez, B., Kundaliya, D., Pasricha, R., Kulkarni, S., & Ogale, S. (2007). Low temperature synthesis of magnetite and maghemite nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(12), 4294–4302. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.873>
- Bordbar, M., Negahdar, N., & Nasrollahzadeh, M. (2018). Melissa Officinalis L. leaf extract assisted green synthesis of CuO/ZnO nanocomposite for the reduction of 4-nitrophenol and Rhodamine B. *Separation and Purification Technology*, 191, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.09.044>
- Castillo-Henríquez, L., Alfaro-Aguilar, K., Ugalde-álvarez, J., Vega-Fernández, L., de Oca-Vásquez, G. M., & Vega-Baudrit, J. R. (2020). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents

- in the agricultural area. *Nanomaterials*, 10(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nano10091763>
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., & Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry - Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 24(1), 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.006>
- Ebrahiminezhad, A., Zare-Hoseinabadi, A., Sarmah, A. K., 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>
- Fahmy, H. M., Mohamed, F. M., Marzouq, M. H., Mustafa, A. B. E. D., Alsoudi, A. M., Ali, O. A., Mohamed, M. A., & Mahmoud, F. A. (2018). Review of Green Methods of Iron Nanoparticles Synthesis and Applications. *BioNanoScience*, 8(2), 491–503. <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0516-5>
- Galdames, A., Ruiz-Rubio, L., Orueta, M., Sánchez-Arzalluz, M., & Vilas-Vilela, J. L. (2020). Zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165817>
- Gaub, M., Roeseler, C., Roos, G., & Kovar, K. A. (2004). Analysis of plant extracts by NIRS: Simultaneous determination of kavapyrones and water in dry extracts of *Piper methysticum* Forst. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(4), 859–864. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.030>
- Gour, A., & Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 844–851. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878>
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H., & Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38(4), 545–560. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (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>
- Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., & Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. 5(2), 217–222.
- KSV, G. (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>
- Madhavi, V. (2013). Synthesis and Spectral Characterization of Iron Based Micro and Nanoparticles. *Iranica Journal of Energy and Environment*, 4(4). <https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2013.04.04.10>

- Manolescu, D., Uță, G., Șuțan, A., Ducu, C., Din, A., Moga, S., Negrea, D., Biță, A., Bejenaru, L., Bejenaru, C., & Avram, S. (2022). Biogenic synthesis of noble metal nanoparticles using *Melissa officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. extracts and evaluation of their biosafety potential. *Caryologia*, 75(3), 65–83. <https://doi.org/10.36253/caryologia-1774>
- Marcos Luciano Bruschi & Lucas de Alcântara Sica de Toledo. (2019). *Pharmaceutical Applications of Iron-Oxide.pdf*. 19.
- Marslin, G., Siram, K., Maqbool, Q., Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2018). Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. *Materials*, 11(6), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ma11060940>
- Mihoci, M. (2015). *Spektrofotometrijsko određivanje boje*. 64, 683–685.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Mohamad, N. A. N., Arham, N. A., Jai, J., & Hadi, A. (2014). Plant extract as reducing agent in synthesis of metallic nanoparticles: A review. *Advanced Materials Research*, 832, 350–355. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.832.350>
- Mohanpuria, P., Rana, N. K., & Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(3), 507–517. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9275-x>
- Nkosinathi, D. G., Albertus, B. K., Jabulani, S. S. E., Siboniso Siphephelo, M., & Pullabhotla, R. V. (2020). Biosynthesis, Characterization, and Application of Iron Nanoparticles: in Dye Removal and as Antimicrobial Agent. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04498-x>
- Noorul Basar, S., & Zaman, R. (2013). An Overview of Badranjboya (*Melissa officinalis*). *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(12), 107–109. www.isca.me
- Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai, A. (2022). *Melissa officinalis* : Composition , Pharmacological Effects and Derived Release Systems — A Review.
- Puthukkara P, A. R., Jose T, S., & S, D. lal. (2021). Plant mediated synthesis of zero valent iron nanoparticles and its application in water treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104569. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104569>
- Salvia, L., Extracts, M. L., Silva, B. N., Cadavez, V., Caleja, C., Pereira, E., Calhelha, R. C., Añibarro-ortega, M., Finimundy, T., Kosti, M., Sokovi, M., Barros, L., & Gonzalesbarron, U. (2023). *Phytochemical Composition and Bioactive Potential of Melissa officinalis* L., *Salvia officinalis* L. and *Mentha spicata* L. Extracts. 1–15.
- Sampaio, S., & Viana, J. C. (2018). Production of silver nanoparticles by green synthesis using artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract and measurement of their electrical conductivity. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(4). <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aae987>

- Sangaiya, P., & Jayaprakash, R. (2018). *A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications*.
- Sentkowska, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2015). Polyphenolic Composition and Antioxidative Properties of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Extract Affected by Different Brewing Processes. *International Journal of Food Properties*, 18(9), 2009–2014. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.960932>
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G. E. J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *U Materials* (Sv. 8, Izdanje 11). <https://doi.org/10.3390/ma8115377>
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Sunita, P., i Palaniswamy, M. (2017). Effect of extract concentration and ageing on optical Properties of biological silver nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8(3). <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.3.b686-690>
- Taniguchi, M., LaRocca, C. A., Bernat, J. D., Lindsey, J.S. (2023). Digital Database of Absorption Spectra of Diverse Flavonoids Enables Structural Comparison and Quantitative Evaluations. *Journal of Natural Products*, 86(4), 1087-1119. <https://doi.org/10.1021/asc.jnatprod.2c00720>
- Yan, W., Lien, H. L., Koel, B. E., & Zhang, W. X. (2013). Iron nanoparticles for environmental clean-up: Recent developments and future outlook. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 15(1), 63–77. <https://doi.org/10.1039/c2em30691c>
- Ziagova, M. G., Mavromatidou, C., Samiotis, G., & Amanatidou, E. (2022). Enhancing phenolic content of medicinal aromatic plants extracts-biofunctional foods preparation. *Plants*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/plants11010076>

Izjava o izvornosti

Ja Maja Drenovac 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.

Vlastoručni potpis