Biokompatibilne nanočestice s povećanom terapeutskom efikasnošću flavonoida

Drušković, Morana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:522830

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Morana Drušković

Biokompatibilne nanočestice s povećanom terapeutskom efikasnošću flavonoida

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Davor Dolar

Članovi ispitne komisije:

doc. dr. sc. Davor Dolar
dr. sc. Suzana Šegota
izv. prof. dr. sc. Juraj Šipušić

Zagreb, rujan 2016.

Najiskrenije se zahvaljujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Suzani Šegoti na stručnom vodstvu, uloženom vremenu i strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog i pismenog dijela diplomskog rada.

Također zahvaljujem se dr. sc. Maji Dutour Sikirić na pomoći i savjetima prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Dariji Jurašin na pomoći pri izvedbi DLS mjerenja.

Zahvaljujem se dr. sc. Goranu Baranviću na FTIR mjerenjima.

Zahvaljujem se dr. sc. Ivi Crnolatacu na UV/Vis mjerenjima.

Hvala mag. ing. cheming. Ekatarini Kristan Mioč na SEM snimkama uzoraka.

Najveća zahvala mojim roditeljima na pruženoj ljubavi, strpljenju i potpori tijekom studiranja. Hvala ostatku moje obitelji i prijateljima što su uvijek bili tu.

Ovaj rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, Zavod za fizičku kemiju, akademske godine 2015./2016.

Sažetak

U okviru ovog rada provedena je fizičko-kemijska i morfološka karakterizacija magnetskih mezoporoznih čestica uzoraka sljedećim tehnikama: UV/Vis spektrofotometrijom, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS).

Provedena su istraživanja s trima različitim flavonoidima (kvercetin, miricetin i miricitrin) koji su otopljeni u smjesi EtOH/H_2O i ugrađeni u Fe_3O_4 nanočestice. Količina ugrađenih flavonoida u nanočestice određena je spektrofotometrijskim mjerenjima supernatanta pomoću UV/Vis spektrometra. Nakon ugradnje flavonoida u nanočestice, praćeno je njihovo otpuštanje iz nanočestica pri normalnim uvjetima, pod utjecajem permanentnog i oscilirajućeg magnetskog polja korištenjem UV/Vis spektrofotometrije

Karakterizacija praznih i napunjenih magnetskih nanočestica kao i morfologija i distribucija veličine nanočestica je provedena FTIR analizom, SEM i DLS mjerenjima. SEM-om se uslijed promjena hrapavosti površine magnetskih nanočestica nakon ugradnje flavonoida potvrdila ugradnja flavonoida na samoj površini nanočestica. Zbog niske koncentracije ugrađenih flavonoida, nije bilo moguće kvantitativno odrediti koncentraciju i prirodu veze između nanočestica i flavonoida pomoću FTIR analize.

U radu istražena je stabilnost praznih Fe_3O_4 nanočestica i nanočestica napunjenih s flavonidom u PBS puferu metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti tijekom 96 sati.

Ključne riječi: flavonoidi, magnetske nanočestice, ugradnja flavonoida u nanočestice, otpuštanje flavonoida

Abstract

Physico-chemical and morphological characterizations of mesoporous nanoparticles were conducted within the framework of this research using several techniques: UV/Vis spectrophotometry, infrared spectroscopy including Fourier transform, scaning electron microscope (SEM) and dynamic light scattering (DLS).

The research was performed using three different flavonoids (quercetin, myricetin and myricitrin) that were dissolved in EtOH/H_2O solution and incorporated in Fe_3O_4 nanoparticles. The quantity of incorporated flavonoids in nanoparticles was determined by spectrophotometric measurment of supernatant with UV/Vis spectrometer. After incorporation of flavonoid within nanoparticles, their release profiles were followed by during the experiment the focus was on releasing the flavonoids from the nanoparticles at the standard conditions and in permanent and oscillating magnetic field using UV/Vis spectrophotometry .

The characterisation of the empty and flavonoid loaded magnetic nanoparticles as well as The morphology and distribution of the nanoparticles were carried out by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, SEM and DLS measurement. SEM confirmed that the change occured at the surface roughness of the magnetic nanoparticles after the incorporation of flavonoids. Due to low concentration of incorporated flavonoids it was not possible to quantitatively determine the concentration and nature of the link between the nanoparticles and flavonoids by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis.

In the research the stability of the empty Fe_3O_4 nanoparticles and nanoparticles loaded with flavonoid dissolved in PBS buffer was examined by the DLS method during 96 hours.

Keywords: flavonoids, magnetic nanoparticles, flavonoid loading , realease of flavonoids from nanoparticles

Sadržaj

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 2

2.1. Polifenoli 2

2.1.1. Flavonoidi 2

2.1.2. Kemijska struktura 3

2.1.3. Kvercetin, miricetin, miricitrin 4

2.2. Nanomaterijali 7

2.2.1. Nanočestice magnetita 7

2.3. Eksperimentalne metode 9

2.3.1. UV/Vis spektrofotometrija 9

2.3.2. Infracrvena spektroskopija-IR 9

2.3.2.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom-FTIR 13

2.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija-SEM 15

2.3.4. Dinamičko raspršenje svjetlosti-DLS 17

2.3.4.1. Zeta-potencijal 21

3. EKSPERIMENTALNI DIO 23

3.1. Kemikalije i otopine 23

3.1.1. Flavonoidi 23

3.1.2. Priprema magnetskih Fe_3O_4 nanočestica 23

3.1.3. Sinteza i karakterizacija magnetskih mesoporoznih Fe_3O_4 23

3.2 Ugradnja i otpuštanje flavonoida iz nanočestica 23

3.3 Metode 24

3.3.1 UV/Vis spektrofotometrija 24

3.3.2 FTIR spektroskopija 25

3.3.3 SEM mjerenja 25

3.3.4 DLS mjerenja 25

4. REZULTATI I RASPRAVA 26

4.1 Učinkovitost ugradnje 26

4.2. Ugradnja i kontrolirano otpuštanje flavonoida 27

4.3 Karakterizacija praznih i napunjenih magnetskih nanočestica s flavonoidima ... 33

4.4. Analiza morfologije agregiranih nanočestica 36

4.5 Raspodjela veličine i zeta potencijal nanočestica u PBS-u 38

5. ZAKLJUČAK 40
6. LITERATURA 42
7. POPIS KRATICA 46

1. UVOD

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva biljnog porijekla koji su pronađeni u voću, povrću, sjemenkama, cvijeću te pićima poput čaja i vina. 1930-e nobelovac Albert Szent Gyorgyi izolirao je novi spoj iz naranče i vjerujući da se radi o novoj vrsti vitamina nazvao ga je vitamin P. Kasnije se uspostavilo da je riječ o flavonoidu (rutin) te su započela brojna istraživanja kojima se pokušalo izolirati različite pojedinačne flavonoide te utvrditi njihovi mehanizmi djelovanja.

Pokazalo se da flavonoidi imaju antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno, antikancerogeno i druga svojstva. Ta svojstva su rezultat sposobnosti flavonoida da hvataju slobodne radikale, inhibiraju specifične enzime i stimuliraju neke hormone i neurotransmitere. Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje, flavonoidi su izuzetno važan dio ljudske prehrane. Također se koriste za prevenciju i liječenja raka kao i za neurodegenerativne bolesti i osteoporozu.[1] Ljudi normalnom dnevnom prehranom osobito voćem i povrćem unose 1-2 g flavonoida. Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost flavonoida ovise o konfiguraciji, ukupnom broju hidroksilnih skupina i supstituciji funkcionalnih grupa unutar njiihove molekulske strukture.[2] U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori, regulatori rasta te kao agensi za privlačenje pozornosti.[3] Regulirajući katabolizam i količinu biljnog hormona auksina flavonoidi imaju važnu ulogu u interakciji između biljke i njenog okoliša.

Istraživanja na kvercetinu (QU), flavonoidu koji pripada podskupini flavonola, pokazala su da njegova konzumacija može poboljšati kognitivne i motoričke funkcije koje su bile oslabljene zbog neurodegenerativnih oštećenja.[4,5] Uz kvercetin, i drugi flavonoli također pokazuju djelotvorne učinke u liječenju i prevenciji Parkinsonove bolesti. Primjerice, flavonoli miricetin (MCE) i miricitrin (MCI) inhibiraju katehol-*O*-metiltransferazu (COMT) koja metabolizira L-levodopu lijek korišten u tretmanu Parkinsonove bolesti. Inhibitori COMT-a vrlo su važni jer se njihovim prisustvom povećava bioraspoloživost i učinkovitost L-levodope.[6] Međutim, neuroprotektivni mehanizam i uloga flavonola u pospješenju apsorpcije lijeka su i dalje nerazjašnjeni.

2. OPĆI DIO

2.1. Polifenoli

Polifenoli su organske molekule koje karakterizira prisutnost više fenolnih skupina. U prirodi ih ima u izobilju u voću; najviše bobičasto voće i citrusi, te povrću, kavi, čaju, čokoladi.[7] Mnoge od tih molekula imaju antioksidativnu aktivnost *in vitro,* ali nije vjerojatno da je imaju *in vivo.* Važne uloge *in vivo* mogu imati različita druga djelovanja polifenola. Oni mogu biti uključeni u međustaničnu signalizaciju, osjetljivost receptora, aktivnost upalnih enzima i gensku regulaciju.

Danas su poznati brojni pozitivni učinci polifenola. Najpoznatiji primjer pozitivnih učinaka polifenola iz crnog vina na kardiovaskularno zdravlje su fenomen francuskog paradoksa te mediteranska prehrana. Francuski paradoks opisuje nisku pojavu koronarne srčane bolesti usprkos prehrani bogatoj zasićenim mastima. Mediteranska prehrana, bogata voćem, povrćem i vinom, također pokazuje protektivno djelovanje na bolesti srca, uključujući reverzibilnost hiperlipidemije, smanjenu aterogenost LDL-čestica te zaštitu kolesterola u LDL-u od oksidacije.[7]

2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se nalaze u prirodnim proizvodima koji su lako dostupni ljudskoj populaciji kao što su voće, povrće, ekstrakti bilja, pića poput vina, piva, kave i raznih biljnih čajeva, te u medu i propolisu.[8,-11] Do danas je identificirano više od 6000 flavonoida i njihov broj neprestano raste.[12]

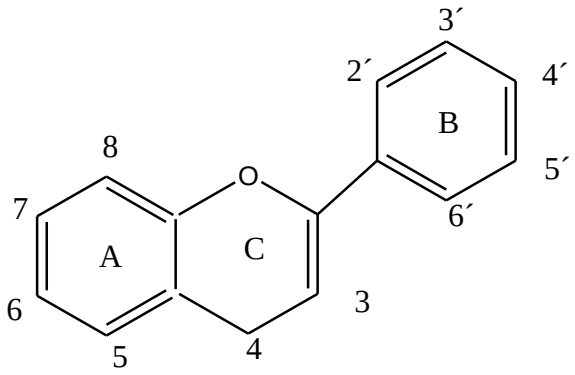
Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti ″hvatanja″ elektrona slobodnog radikala, helatnog vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}),[13] aktiviranja antioksidacijskih enzima[14] i inhibiranja oksidaza.[15] Flavonoidi iskazuju selektivni učinak prema stanicama tumora te smanjuju popratne štetne učinke zračenja i kemoterapeutika. Potvrđeno je da flavonoidi svojim djelovanjem mogu pojačati protuproliferativni učinak nekih kemoterapeutika.[11]

Raznim mehanizmima flavonoidi imaju potencijal za prevenciju kardiovaskularnih bolesti uključujući poboljšanje endotelne funkcije, sniženje krvnog tlaka, inhibiciju oksidacije lipoproteina, smanjenje koncentracije lipoproteina, smanjenje akumulacije kolesteril-estera u makrofagima te reguliranje dislipidemije.[16] Mehanizam djelovanja flavonoida na molekularnoj razini u biološkim sustavima nije potpuno razjašnjen, zbog velike razlike u kemijskim svojstvima i zbog njihove velike strukturne heterogenosti.[3]

Epidemiološke studije[17] pokazuju da unos hrane bogate flavonoidima smanjuju rizik kardiovaskularnih bolesti. *In vitro* i *in vivo* studijima pokazano je da flavonoli iz hrane imaju mnoga biološka i medicinska svojstva: antioksidativno[18], antitrombotsko, antiinflamatorno, antiaterogeno, antiaterosklerotsko[19], hipoglikemijsko, hipotenzivno[20], hipokolesterolmenijsko[21] te kardioprotektivno.[22]

2.1.2. Kemijska struktura

Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil) propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojeg proizlaze osnovne strukture flavonoida: flavanoni, flavanoli, flavoni, flavonoli, antocijanidini i izoflavoni čije su strukture prikazane na slici 1.



Slika 1: Osnovna kemijska struktura flavonoida[12]

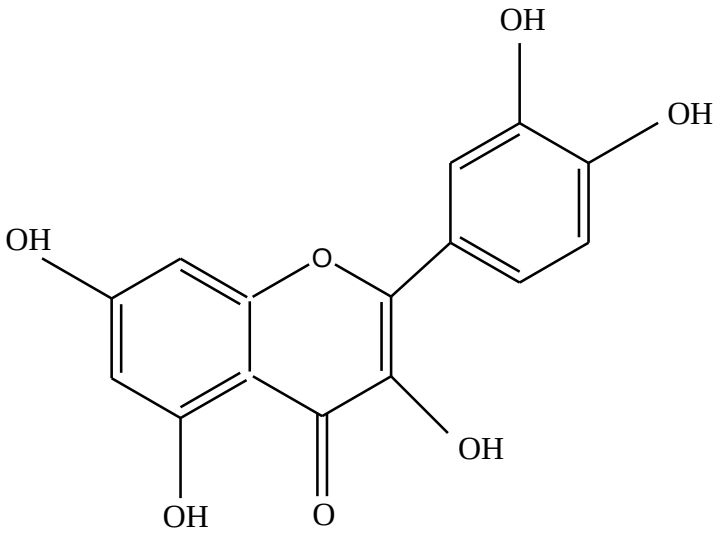
Mogu se smatrati derivatima benzo-γ-pirona ili benzo-γ-pirana. Svi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela.[14] Kod flavonoida postoji velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini).

Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije. Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Šećeri koji se najčešće javljaju jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramoza i ksiloza.

2.1.3. Kvercetin, miricetin, miricitrin

Kvercetin, miricetin i miricitrin su polifenolni spojevi koji spadaju u grupu flavanola. Razlike u njihovoj strukturi su vrlo male. Svaki od ova tri flavonoida se sastoji od 2 benzenska prstena A i B te središnjeg prstena C.

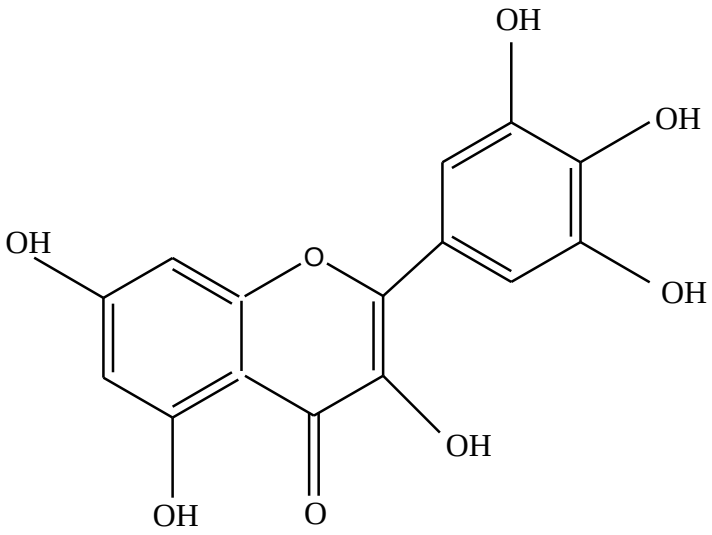
Kvercetin (QU, $C_{15}H_9O_7$) je polifenolni spoj koji posjeduje hidroksilne skupine vezane na 3, 5, 7, 3´, 4´ pozicijama te jednu na poziciji 3 (Slika 2). Kvercetin je jedan od najzastupljenijih flavonoida u prehrani. Zbog specifične kemijske strukture i bioloških svojstava jedan je od najproučavanijih flavonoida kao potencijalni lijek koji bi se rabio za liječenje kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i tumorskih bolesti. Kvercetin zbog svoje planarne kemijske strukture vrlo lako stupa u interakciju s metalnim ionima te tvori helate.[15] Prisutan je u hrani (voće, povrće, začini), čaju (*Camellia sinensis L*), vinu, a brojni istraživači upozoravaju da je i najučinkovitiji flavonoid. On je jak protuoksidans te pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje s obzirom da ima protualergijsko, protuupalno, protureumatsko, protuvirusno i protukancerogeno djelovanje.[23]



Slika 2: Kemijska struktura kvercetina[12]

Miricetin (MCE, $C_{15}H_{10}O_8$) se sastoji od 2 benzenska prstena A i B te prstena C i posjeduje hidroksilne skupine na 3, 5, 7, 3′, 4′ i 5′ položajima (slika 3). Zastupljen je u bobičastom voću i crvenom grožđu, povrću, crvenom vinu, orasima, luku, koji djeluje kao snažan antioksidans. Mnoge studije pokazuju antioksidativno, antiviralno, antikancerogeno, antitrombotsko, hipologlikemijsko, antihipertenzivno i citoprotektivno djelovanje miricetina.[24] Farmakološke studije su pokazale da miricetin posjeduje antiupalna svojstva i pozitivno djeluje u liječenju infekcija mokraćnog trakta te štiti jetru. Njegov pozitivan učinak u liječenju Parkinsonove bolesti dokazan je *in vivo* i *in vitro* na način da smanjuje učinak oksidacije i apoptoze.[25]

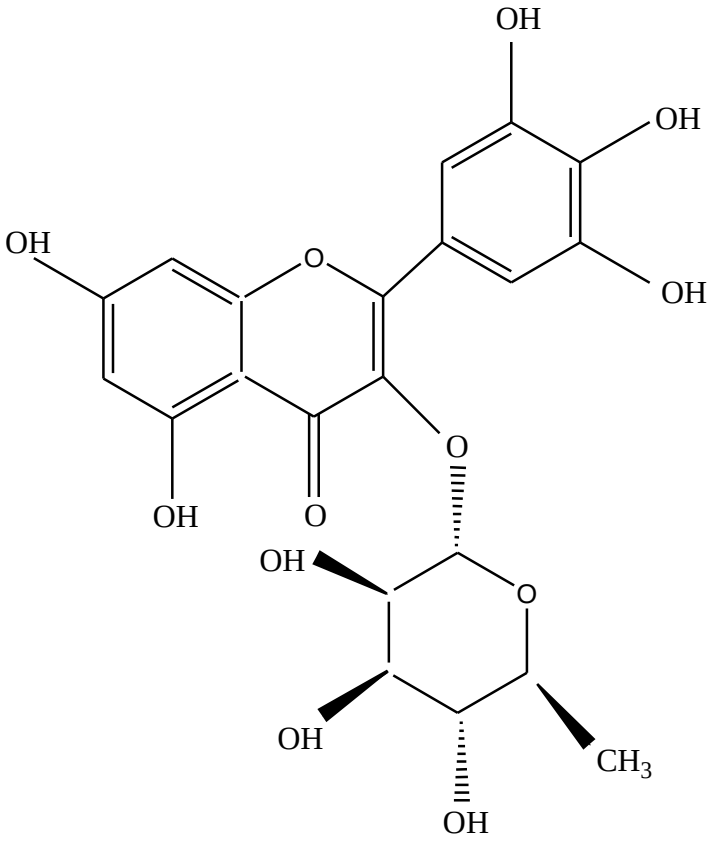
Dokazano je da miricetin potiskuje dobivanje tjelesne mase i akumulaciju tjelesnih masnoća povećavajući oksidaciju masnih kiselina kod štakora s hiperlipidemijom, odnosno posjeduje hipolipemično svojstvo. Također, dokazano je da ima protektivni učinak na oksidaciju LDL-a u krvi, potaknutu metalnim ionima i slobodnim radikalima. Osim toga, miricetin blokira unos oksidiranog LDL-a u makrofage te ima esencijalnu ulogu u prevenciji ateroskleroze.[22]



Slika 3: Kemijska struktura miricetina[12]

Miricitrin (MCI, $C_{21}H_{20}O_{12}$) je polifenolni spoj koji se nalazi u prirodi. Kao i miricetin, sastoji se od 2 benzenska prstena A i B te središnjeg prstena C. Hidroksilne skupine miricitrin su na 5, 7, 3′, 4′ i 5′ pozicijama, a na poziciji 3 C-prstena umjesto OH-skupine pojavljuje se šećer ramnoza (Slika 4). Pokazuje pozitivan učinak na liječenje anksioznosti kao inhibitor dušikovog oksida (NO) i protein-kinaze C te raznih neuroloških bolesti kao npr.

Parkinsonova bolest.[26] Također je dokazan antimutageni učinak miricitrina što se pripisuje sposobnosti uklanjanja slobodnih hidroksilnih radikala.[27] Uspoređujući s drugim analgeticima poput aspirina acetaminofena i diklofenaka, miricitrin ubrizgan intravenozno pokazuje puno veću moć u otklanjanju nociceptivne boli. U slučaju oralne administracije miricitrina ta moć slabi jer se glikozidate poput miricetina slabo apsorbiraju unutar organizma.[26]



Slika 4: Kemijska struktura miricitrina[28]

Kvercetin i miricitrin, bioflavanoidi su efikasnog djelovanja, naročito kvercetin, koji sprečava djelovanje enzima ″aldozne reduktaze″u stvaranju katarakte kod dijabetičara te je dobar prirodni antihistaminik.[29]

2.2. Nanomaterijali

Nanostrukture ili nanomaterijali su materijali koji sadrže čestice kojima je barem jedna dimenzija u navedenom nanopodručju. Prefiks *nano* znači faktor 10^{-9}. To su jednokomponentni ili višekomponentni prirodni, slučajno dobiveni ili proizvedeni materijali koji sadrže čestice u vezanom stanju ili kao agregati ili aglomerati, kod kojih je barem jedna dimenzija komponente u rasponu između 0,1 i 100 nm. Toj skupini pripadaju nanočestice, nanovlakna i nanocjevčice, nanokompoziti i nanostrukturirane površine. Kuglaste nanočestice su trodimenzionalne na nanoskali, tj. svaka prostorna dimenzija je između 0,1 i 100 nm.[30,31] Vrlo često se pojmovi nanomaterijala i koloida koriste kao sinonimi, iako to nije točno. Koloidi se prema veličini mogu definirati kao čestice u rasponu dimenzija od 1 do 1000 nm, što znači da su svi nanomaterijali koloidi, ali nisu svi koloidi nanomaterijali.[32]

Nanočestice i nanomaterijali imaju veliku primjenu u elektronici, fizici, dizajnu materijala, upotrebljavaju se kao senzori, katalizatori, a sve više i u biomedicini. Čestice na nanoskali imaju drukčija, tj. bolja ili potpuno nova optička, elektronska, magnetska, površinska i mehanička svojstva. Razlog korištenja nanočestica u dimenzijama nužnim za pojedinu primjenu; npr. za biomedicinsku primjenu potrebno je da su čestice manje od 100 nm (optimalno 6-15 nm) da bi mogle proći kroz kapilare i da ne budu uklonjene od makrofaga te da su uniformne (čestice uske distribucije po veličini).[33,34,35]

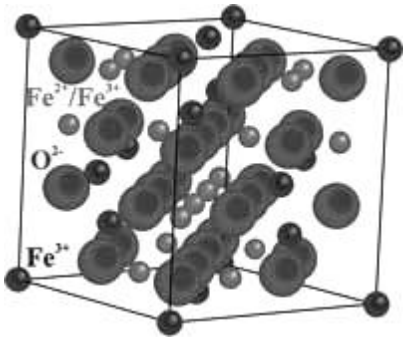
Zanimanje za nanočestice u stalnom je porastu, uglavnom zbog njihovih posebnih svojstava, potpuno različitih od svojstava istog materijala većih dimenzija. Rabe se u proizvodnji hrane, sredstava za zaštitu od sunca, pasti za zube, proizvoda za njegu kože, antibakterijskih srebrnih premaza i sl. Utjecaj nanočestica na stanice organizma nije još detaljno analiziran i zato su potrebne nove metode i normirani postupci analize kako bi se mogla procijeniti potencijalna opasnost izlaganja ljudi nanočesticama.[36]

2.2.1. Nanočestice magnetita

Nanočestice su ″superfine″ čestice veličine od 1 nm do 1 μm, odnosno umanjene čestice nekog elementa koje su zadržale sva svojstva nekog elementa, ali i poprimile neka posebna svojstva. Zbog velike površine i malog promjera, koji su preduvjet za biološku

aktivnost nanočestica, vrlo su reaktivne i mogu pokazivati jedinstvenu bioraspodjelu određenu veličinom.[30]

Kemijska fomula magnetita je Fe_3O_4 (FeO x Fe_2O_3). Magnetit je crni feromagnetični željezov oksid u kojem željezovi atomi imaju dva oksidacijska stanja, +2 i +3. Obično tvori oktaedarske kristale i ima strukturu inverznog spinela u kojoj se u šupljinama unutar kubične guste slagaline kisikovih aniona nalaze kationi željeza oksidacijskog stanja +2 i +3. U jednoj četvrtini tetraedarskih šupljina smješteni su kationi Fe^{3+}, a u drugoj polovini oktaedarskih šupljina smješteni su kationi Fe^{2+} i Fe^{3+}.[37] Elektroni se mogu kretati na sobnoj temperaturi između Fe^{2+} i Fe^{3+} iona u oktaedarskim pozicijama, prikazujući magnetit kao polumetalni materijal.



Slika 5: Struktura i jedinična čelija magnetita[38]

Efektivna površina magnetita raste sa smanjenjem veličine čestica.[38] Tvrdoća magnetita se kreće od 5,5 do 6,5 na skali, a specifična masa iznosi 5,18 g.

Magnetit se može pripremiti u obliku dobro dispergiranih nanočestica manjih od 4 nm, koje imunosni sustav ne prepoznaje. Nanoporozni materijali su porozni kristalni materijali, sastavljeni od nanokristala između kojih postoje pore. Pore omogućuju posebnu primjenu takvih materijala. Nanoporozni materijali se u osnovi dijele na nanoporozne materijale i masivne nanoporozne materijale koji se prema veličini pora dijele na mikroporozne (0,2 do 2 nm), mezoporozne (2 do 50 nm) i makroporozne (50 do 100 nm). Zbog te posebne strukture (velik broj pora, veliki omjer površine i mase, mala gustoća) nanoporozni materijali mogu imati tehnološku primjenu kao katalizatori ili kao materijali za apsorpciju određenih plinova i tekućina, a mogu imati i posebna električna kao i optička svojstva. Stavljanjem drugih materijala u pore mogu se mijenjati fizička svojstva, a naknadnim uklanjanjem osnovnog materijala moguće je dobiti nanocjevčice od materijala koji je bio unutar pora.[39]

Nanočestice magnetita pobuđuju velik interes zbog primjene u biomedicini. Na temelju fizikalnih, kemijskih, toplinskih i mehaničkih svojstava omogućuje veliki potencijal za biomedicinsku primjenu, kao što su: stanična terapija, obnavljanje tkiva, isporuka lijekova, povećanje kontrasta rezonantne slike, te se može vezati za lijekove proteine, enzime, antitijela, nukleotide[40].

2.3. Eksperimentalne metode

2.3.1. UV/Vis spektrofotometrija

Spektorfotometrija je metoda kojom se mjeri koliko neka kemijska tvar apsorbira zračenje mjereći intenzitet zrake koja prolazi kroz uzorak. Osnovni princip je da svaka komponenta apsorbira ili propušta svjetlo u određenom rasponu valnih duljina.

Spektrofotometar je instrument koji mjeri količinu fotona (intenzitet svjetla) nakon što prođe kroz uzorak. UV/Vis spektrometar koristi zraku u ultraljubičastom području (185-400 nm) i u vidljivom području (400-700 nm).[41]

Intenzitet elektomagnetskog zračenja I_0 smanjuje se prolazom kroz otopinu. Smanjenje intenziteta ovisi o koncentraciji tvari (c) koja apsorbira zračenje, debljini sloja, optičkom putu kroz uzorak (b), molarnom apsorpcijskom koeficijentu, specifičnom za svaku tvar, a mijenja se s valnom duljinom (ε). Odnos intenziteta prije i poslije prolaza kroz uzorak definirali su Lambert, Beer i Bourguer zakonom apsorpcije:

$$log\frac{I_0}{I} = A = \varepsilon * c * b \qquad (1)$$

Osnovni dijelovi spektrofotometra su: izvor svjetlosti, držač uzorka, monokromator i detektor.[42]

2.3.2. Infracrvena spektroskopija-IR

Infracrveno zračenje je elektromagnetsko zračenje valnih duljina od 0,7 do 500 μm. Naziv je dobio jer je energija infracrvenog zračenja manja od energije vidljivog dijela spektra

na koji se i nastavljaju. Općenito je prihvaćeno izražavanje energije zračenja pomoću valnih brojeva $\hat{v}$. Valni broj je recipročna vrijednost valne duljine:

$$\hat{v} = \frac{1}{\lambda} = \frac{n*v}{c} \quad (2)$$

što je proporcionalno s energijom (E) i frekvencijom fotona (v), gdje je n-indeks loma sredstva, a c - brzina elektromagnetskog zračenja u vakuumu.

Infracrvena spektroskopija je jedna od najčešćih spektroskopskih tehnika korištenih od strane kemičara i fizičara koja proučava interakcije molekula i elektromagnetskog zračenja u rasponu od 12 800 cm^{-1} do 10 cm^{-1}. Da bi takvo međudjelovanje bilo moguće potrebno je da molekula ima dipolni moment koji je pod utjecajem elektromagnetskog polja promjenjiv. IR zračenjem pobuđuju se prijelazu među vibracijskim stanjima molekula, a prijelaz je zabilježen kao signal u IR spektru. Područje infracrvenog zračenja podijeljeno je na tri dijela: blisko, srednje i daleko (tablica 1).

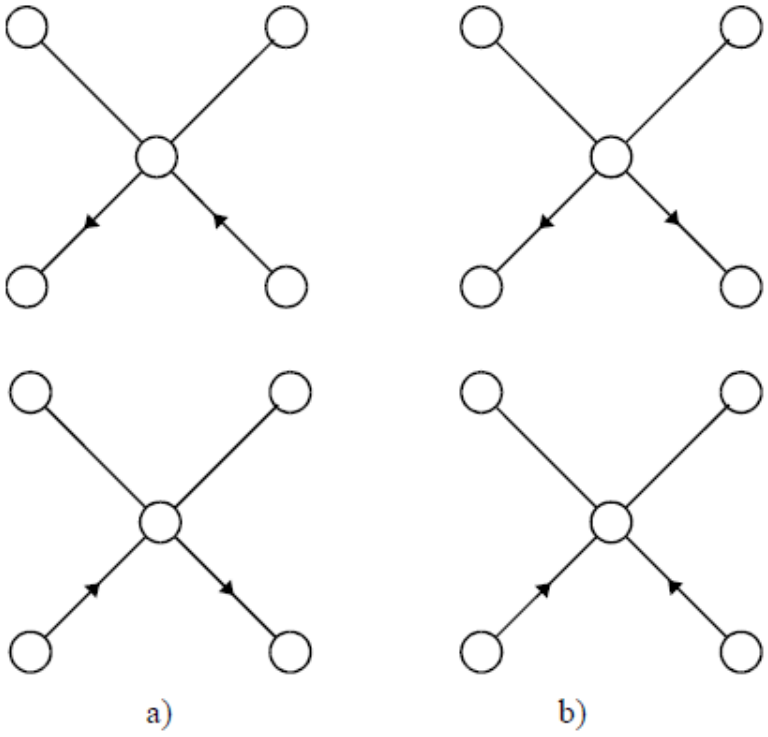
Tablica 1: Područja infracrvenog zračenja

	λ	$\hat{v}$
blisko	0,7-2,5 μm	13 000-4 000 cm^{-1}
srednje	2,5-25 μm	4 000-400 cm^{-1}
daleko	25-100 μm	400-100 cm^{-1}

Apsorpcije u infracrvenom području odgovaraju promjenama u vibracijskim i rotacijskim nivoima u molekuli. Do takvih promjena dolazi kada frekvencija promjenjivog električnog polja postigne moguću promjenu frekvencije vibracije ili rotacije molekule.

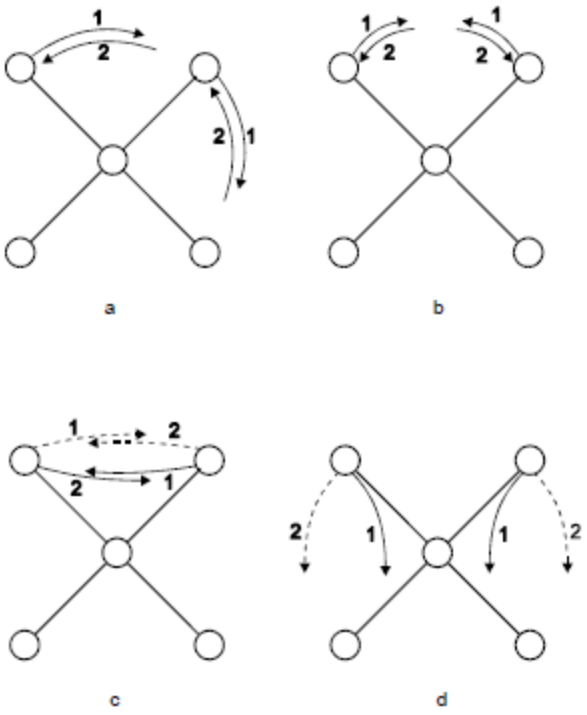
Molekula može apsorbirati infracrveno zračenje ako u trenutku apsorpcije postoji promjena dipolnog momenta. Ako takva promjena u raspodjeli naboja ne postoji, u molekuli ne dolazi do interakcije s električnom komponentom zračenja, pa se energija ne može prenjeti na molekulu. Molekule koje imaju simetričnu raspodjelu naboja, tj. molekule kod kojih nema promjene dipolnog momenta niti kada vibriraju s drugačijom amplitudom, ili rotiraju, ne dolazi do apsorpcije. Za takve se molekule kaže da su inaktivne u infracrvenom području.

Molekulske vibracije se mogu svrstati u dvije kategorije: vibracije rastezanja (eng. *stretching*) i vibracije svijanja (eng. *bending*). Vibracije rastezanja odgovaraju oscilacijama uzduž međunuklearne osi i one mogu biti simetrične ili asimetrične. Asimetrično rastezanje se događa kad se jedna jezgra približava centru masa dok se druga istovremeno od njega udaljava (slika 6a). Simetrično rastezanje je vibracija pri kojoj se dvije jezgre istovremeno približavaju istoj točki ili se od nje udaljavaju. To rastezanje predstavlja simetričnu vibraciju. (slika 6b).



Slika 6: Prikaz vibracija rastezanja višeatomne molekule

Vibracije svijanja ili deformacije su gibanja jezgara koja uzrokuju promjene kuta između dviju veza koje vibriraju, te se dijele na deformacije u ravnini i izvan ravnine. U slučaju skupine tri atoma u kojoj su dva istovrsna atoma vezana na atom druge vrste razlikuju se četiri vrste deformacijskih vibracija (slika 7): njihanje (eng. *rocking*), striženje (eng. *scissoring*), uvijanje (eng. *twisting*) i mahanje (eng. *wagging*).



Slika 7: Prikaz vibracija deformacija višeatomne molekule. Strelice označene punom crtom označavaju gibanje jezgara iznad, a crtkanom ispod ravnine papira

Moguća su i vibracijska sprezanja (eng. *coupling*) među molekulama, a do njih dolazi kada su grupe koje vibriraju vrlo blizu, odnosno kad vibriraju kod približno istih frekvencija. Sprezanje se najčešće javlja kod vibracija istezanja koje imaju zajednički atom, a kod vibracija deformacije kada vibrirajuće grupe dijele zajedničku kemijsku vezu. Dakle sprezanja se događaju kada je jedna veza koja se rasteže i steže ujedno i veza koja je uključena u deformaciju. Vibracijsko sprezanje je rijetko, a opaža se kada su vibrirajuće grupe odvojene međusobno preko više od jedne veze.

Svaka vibracija je potencijalno moguća apsorpcijska vrpca u infracrvenom spektru i ako je poznat broj atoma (N) u molekuli, moguće je izračunati ukupan broj vibracija. Za nelinearne molekule broj vibracija jednak je 3N-6, a za linearne molekule 3N-5. Taj broj vibracija proizlazi iz toga što kod nelinearnih molekula postoji stupanj slobode translacije i 3 stupnja rotacije, a kod nelinearnih molekula postoje samo 2 stupnja slobode rotacije jer rotacija oko internuklearne osi ne predstavlja gibanje.

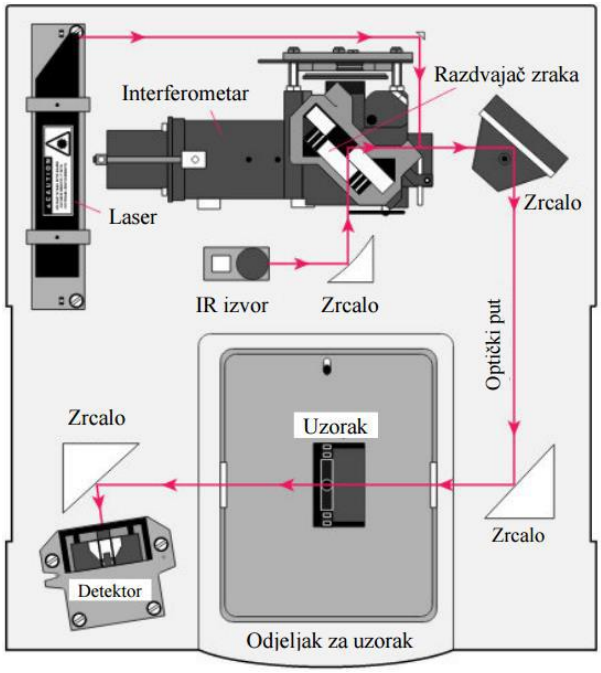
Položaj apsorpcijskih vrpci u infracrvenom spektru neke molekule ovisi o više čimbenika, a to su relativne mase atoma, polarnost molekule, jakost veze među atomima i dr., a moguće su i dodatne interakcije između vibracija unutar iste molekule. Također utječu i neki

vanjski čimbenici čiji utjecaj ovisi o uvjetima u kojima se mjerenje izvodi (npr. solvatacija, međumolekulske vodikove veze i dr.). Na izgled spektra može utjecati i koncentracija ispitivanog uzorka, jer se povećanjem koncentracije povećava i mogućnost međumolekulskih interakcija. Važan čimbenik je temperatura pri kojoj se provodi snimanje, zato što se pri povišenoj temperaturi mijenjaju rotacijske razine molekule, a to se manifestira proširenjem apsorpcijske vrpce.[43]

2.3.2.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom-FTIR

Osnovna primjena infracrvene spektroskopije je identifikacija nepoznatih supstanci pomoću infracrvenog zračenja. Najčešće se promatra apsorpcija u ovisnosti o valnoj duljini. Kako bi došlo do pojave, atomi i molekule u uzorku moraju titrati s frekvencijom u infracrvenom dijelu elektromagnetskog spektra. Kako atomi u metalu nemaju takvih dipolnih oscilacija ova metoda se ne može koristiti za metale. Kod spektrometra s Fouirierovom transformacijom, sve frekvencije se mjere istovremeno i dobiveni interferogram se obrađuje pomoću računala da bi se dobilo traženo frekventno područje.

U ovoj metodi se mjeri apsorbancija ili transmitancija infracrvenih zraka koje prolaze kroz uzorak. Rezultirajući spektar predstavlja molekularnu apsorpciju i transmisiju odnosno prijenos, stvarajući molekularni otisak uzorka. Metoda je razvijena kako bi prevladala ograničenja koja sadrže disperzivni instrumenti. Dijelovi potrebni za izvođenje ovakve vrste spektroskopije su prikazani na slici 8.



Slika 8: Dijelovi potrebni za FTIR[44]

Da bi se provelo testiranje nekog uzorka potrebni su izvor, interferometar, uzorak, detektor i računalo. Najvažniji dio predstavlja jednostavan optički uređaj interferometar. Interferometar proizvodi jedinstvenu vrstu signala i sadrži sve infracrvene frekvencije. Signal se može mjeriti jako brzo, obično u sekundi. Sadrži razdvajač zraka koji prima ulaznu infracrvenu zraku i razdvaja ju u dvije optičke zrake. Jedna zraka se reflektira od ravnog zrcala koje je fiksirano u mjestu, a druga se reflektira od ravnog zrcala koje je na mehanizmu koji dozvoljava tom zrcalu da se pomiče po kratkoj udaljenosti od razdvajača zraka. Put jedne zrake koja prolazi je konstantne duljine, a druge se konstantno mijenjaju kako se zrcalo pomiče, signal koji izlazi iz interferometra je rezultat djelovanje između te dvije zrake. Rezultirajući signal se zove interferogram i ima jedinstveno svojstvo da svaki podatak zrake koji tvori signal ima informacije o svakoj infracrvenoj frekvenciji koja dolazi iz izvora. Kada je interferogram mjeren, sve frekvencije se istovremeno izmjere, što dovodi do brzih vremena mjerenja. U ovoj metodi je potrebno dekodirati pojedine frekvencije, a to se rješava upotrebom matematičke tehnike zvane Fourierova transformacija. Ova transformacija je izvedena pomoću računala koji prikazuje korisniku željeni spektar podataka potrebnih za analizu.

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom može identificirati nepoznate materijale, odrediti kvalitetu ili postojanost uzorka, odrediti količinu komponenata

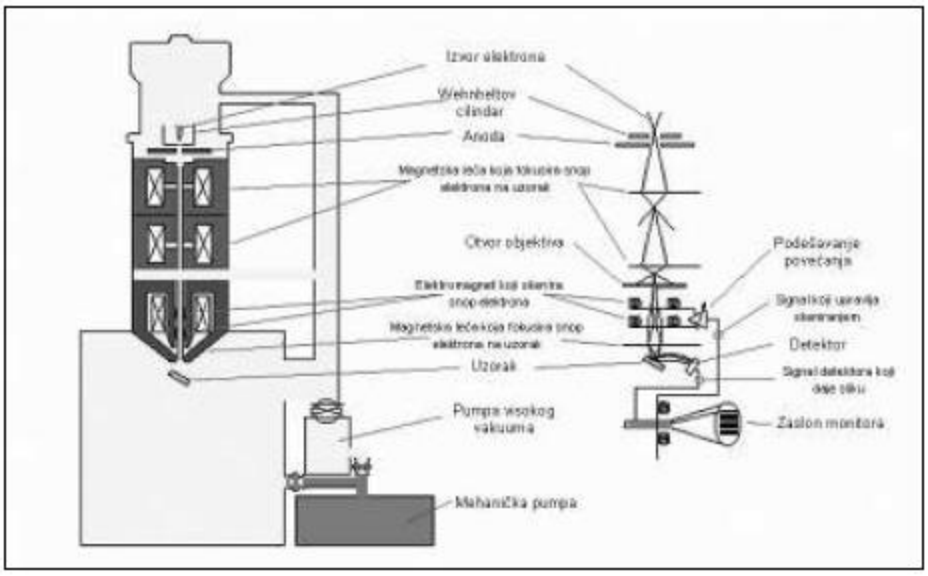
mješavine, a može se koristiti i za površinsku karakterizaciju poluvodičkih materijala. Koriste se valne duljine od 850 do 1300 nm, a razlučivanje površinskih defekata je oko 1 μm. Mjerenja s FTIR-om su vrlo precizna i izvodljiva, te je metoda pogodna za identifikaciju bilo kojeg uzorka. Velika osjetljivost omogućuje identifikaciju čak i najmanjih čestica i nečistoća.[44]

2.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija-SEM

Mikroskopija je jedna od najstarijih i najizravnijih metoda određivanja veličine i oblika čestica. Slika uzorka je uvećana te se veličina čestica može odrediti uspoređivanjem s odgovarajućom skalom.[45] Elektronski mikroskop je razvijen kada je valna duljina postala ograničavajući faktor kod svjetlosnog mikroskopa. Elektroni imaju mnogo kraće valne duljine, što omogućuje bolju rezoluciju.[46]

Skenirajući elektronski mikroskop se sastoji od elektronske kolone koja stvara snop elektrona, komore za uzorke gdje snop elektrona ″pada″ na uzorak, detektora koji promatraju varijabilnost signala koji dolaze od interakcije uzorka i snopa te sustava za gledanje koji pretvara signale u vidljivu sliku. Komora u kojoj se stvara snop elektrona nalazi se na vrhu kolone. U njoj elektrostatsko polje usmjerava elektrone koji se emitiraju iz vrlo malog dijela površine elektrode, kroz mali otvor na Wehnheltovom cilindru.

Elektronski top ubrzava elektrone niz kolonu prema uzorku s energijama koje se kreću u rasponu od nekoliko stotina do desetak tisuća volti, te stvara usmjerenu zraku elektrona koja je stabilna i dovoljno snažna pri najmanjoj mogućoj površini. Elektroni se emitiraju iz elektronskog topa kao divergentna zraka. Skup magnetskih leća i otvora unutar kolone rekonvergiraju i fokusiraju snop u umanjenu sliku sjecišta zraka. Blizu dna kolone nalazi se set skenirajućih elektromagneta koji na specifičan način deflektiraju zraku prema zadnjoj leći, koja fokusira snop u što manju točku na površini uzorka. Snop elektrona izlazi iz kolone u komoru s uzorcima. U komori se nalazi ploča (eng. *stage*) koja omogućuje manipulaciju s uzorkom, odnosno ladica koja je hermetički zabrtvljena, a služi za umetanje i uklanjanje uzorka, ulazni konektori za umetanje raznih detektora signala i ostalih dodatnih uređaja. Kako elektroni iz snopa prodiru na uzorak, tako predaju energiju, koja se emitira iz uzorka na nekoliko načina. Svako emitiranje znači i potencijalni signal za detektore, koji iz njih mogu kreirati odgovarajuću sliku.



Slika 9: Shematski prikaz dijelova skenirajućeg elektronskog mikroskopa[47]

Elektroni u SEM uređaju nikada ne formiraju stvarnu sliku uzorka. SEM konstruira virtualnu sliku iz signala koji su emitirani iz uzorka. Elektronskim snopom uređaj skenira liniju po liniju preko kvadratnog predloška na površini uzorka. Predložak skeniranja definira površinu koja će biti prikazana na slici. U svakom trenutku procesa snop elektrona osvjetljava samo jednu točku na predlošku. Kako se snop elektrona pomiče od točke do točke, signali koji se stvaraju variraju snagom, reflektirajući na taj način različitosti uzorka. Izlazni signal je stoga periodički tok podataka. SEM uređaji koriste jednostavan prikaz slike temeljen na katodnoj cijevi (eng. *Cathode Ray Tube-CRT*). Katodna cijev se sastoji od vakuumske cijevi kojoj se na jednom kraju nalazi fosforni premaz koji pobuđen elektronima emitira svjetlost, a na drugom kraju izvor elektrona i skup deflektirajućih elektromagneta. Kao u SEM uređaju formira se snop elektrona i ubrzava se prema fosforu. Skup elektromagneta skeniraju snop prema rasterskom predlošku, a fosforni premaz, pobuđen elektronima pretvara energiju elektrona u vidljivu svjetlost. Intenzitet svjetla ovisi o intenzitetu snopa u katodnoj cijevi. Usklađivanjem CRT skeniranja i SEM skeniranja te moduliranjem CRT elektronskog snopa sa signalom slike, sustav prikazuje točku na CRT, prikazujući sliku skenirane točke na površini uzorka.

Skenirajući elektronski mikroskop je idealan uređaj za snimanje prijelomnih površina svih vrsta materijala (metal, tekstil, prirodni materijali itd.). Njegovom primjenom ulazimo u svijet bio-, nano- i mikrotehnologije, te je moguća analiza kemijskog sastava prijelomne površine registriranjem rendgenskog zračenja prijelomne površine. Ima izrazitu prednost nad

ostalim mikroskopima u području nekoliko osnovnih mjerenja i metoda. Jedna od najuvjerljivijih je rezolucija-sposobnost da se ″vide″ vrlo mali objekti. Nadalje, dubina polja-sposobnost da objekti različite ″visine″ na uzorkovanoj površini ostanu u fokusu, te mikroanaliza-sposobnost da se analizira sastav uzorka.[47]

2.3.4. Dinamičko raspršenje svjetlosti-DLS

Dinamičko raspršenje svjetlosti jedna je od najčešće primjenjivanih i najkorisnijih metoda za određivanje veličine čestica u suspenziji. Temelji se na promjenifrekvencije izvorne svjetlosti i svjetlosti raspršene na česticama. Do raspršenja zračenja dolazi samo u heterogenim sustavima, zbog razlike u optičkim svojstvima između dispergiranih čestica i medija u kojem se one nalaze.

Djelovanjem monokromatskog zračenja, poput lasera na suspenziju u kojoj se kreću čestice Brownovim gibanjem dolazi do raspršenja svijetlosti. Brownovo gibanje je nasumično gibanje čestica do kojeg dolazi zbog sudaranja s molekulama otapala. DLS mjeri brzinu Brownovog gibanja čestica i povezuje ju s veličinom čestice u suspenziji. Što je čestica suspendirana u mediju veća, to će njeno gibanje biti sporije.[48] Brzina čestica je definirana preko translacijskog difuzijskog koeficijenta (D) koji se računa pomoću Einstein-Stokesove jednadžbe:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \qquad (3)$$

gdje je k_B Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η viskoznost otapala, a d hidrodinamički promjer čestice.[49]

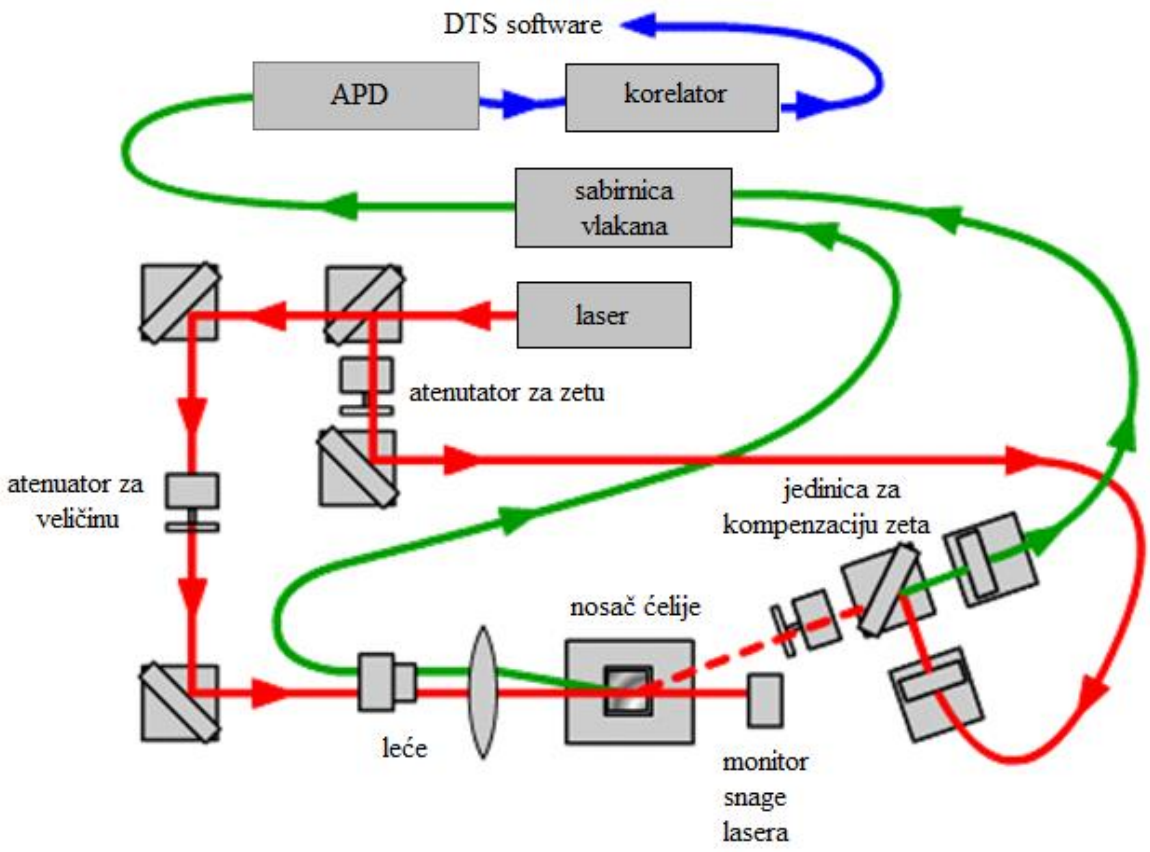
Vrijednost difuzijskog koeficijenta ovisi o veličini same čestice, ionskoj jakosti medija, strukturi površine i obliku čestice. Ionska jakost i vrsta iona utječu na brzinu difuzije čestice tako da mijenjaju debljinu električnog međupovršinskog sloja. Bilo koja promjena površine čestice koja utječe na brzinu difuzije rezultirat će promjenom hidrodinamičkog sloja. Velika ionska jakost medija smanjuje međupovršinski sloj, zbog čega se povećava brzina difuzije, a hidrodinamički promjer je manji i obratno.

Prilikom određivanja veličine čestica pojavljuje se problem kako izraziti veličinu nesferičnih čestica. Sfera je jedini oblik čija se veličina može izraziti jednim brojem-

polumjerom ili promjerom. Hidrodinamički promjer nesferičnih čestica je promjer ekvivalentne sfere, tj. sferične čestice čiji je difuzijski koeficijent jednak izmjerenom difuzijskom koeficijentu nesferične čestice. Različite metode mjerenja su osjetljive na različita svojstva čestica (npr. gustoća, intenzitet, broj) i dati će različite prosječne veličine i raspodjelu veličina za dani uzorak. Niti jedan od tih rezultata nije u potpunosti točan.

Postoje tri teorije kojima se opisuje raspršenje svjetlosti: Rayleigheva aproksimacija, Mieova i Rayleigh-Gans-Debye teorija. Rayleigheva aproksimacija vrijedi za čestice koje su u usporedbi s valnom duljinom lasera male $\left(d = \frac{\lambda}{10}\right)$ i pokazuje da je $I \sim d^6$ i $I \sim \frac{1}{\lambda^4}$, gdje je I intenzitet raspršenog zračenja, d promjer čestice, a λ valna duljina lasera. Proporcionalnost intenziteta i veličine čestice ukazuje na mogućnost da raspršenje većih čestica prekrije raspršenje manjih. Mieova se teorija primjenjuje za čestice čija je veličina približno jednaka valnoj duljini lasera $(d \approx \lambda)$. Rayleigh-Gans-Debye teorija primjenjuje se za nešto veće čestice koje imaju mali relativni indeks loma svjetlosti. Ova teorija omogućuje transformaciju izmjerene raspodjele veličine po intenzitetu u raspodjelu po volumenu, a može se smatrati modificiranom Rayleighevom aproksimacijom.

Shematski prikaz tipičnog instrumenta za DLS je prikazan na slici 10. Kao izvor svijetlosti koristi se He-Ne laser čija zraka pada na uzorak pomoću sustava leća. Raspršena svjetlost detektira se na fotodiodi (APD) pri kutu od 173°. Intenzitet raspršenog zračenja mora biti u određenom rasponu kako bi ga detektor uspješno izmjerio. Detektor će postati zasićen ako detektira previše svjetlosti. Kako bi se izbjeglo zasićenje, koristi se atenuator koji smanjuje intenzitet laserske zrake, odnosno intenzitet raspršene svjetlosti. Za uzorke koji ne raspršuju puno svjetlosti, odnosno one niskih koncentracija ili oni koji sadrže male čestice, potrebno je povećati količinu raspršenog svjetla. U tom slučaju atenuator će dozvoliti da veći intenzitet laserske zrake padne na uzorak. Za uzorke koji raspršuju više svjetlosti, oni koji sadrže veće čestice ili su veće koncentracije, atenuatorom se smanjuje intenzitet laserske zrake.

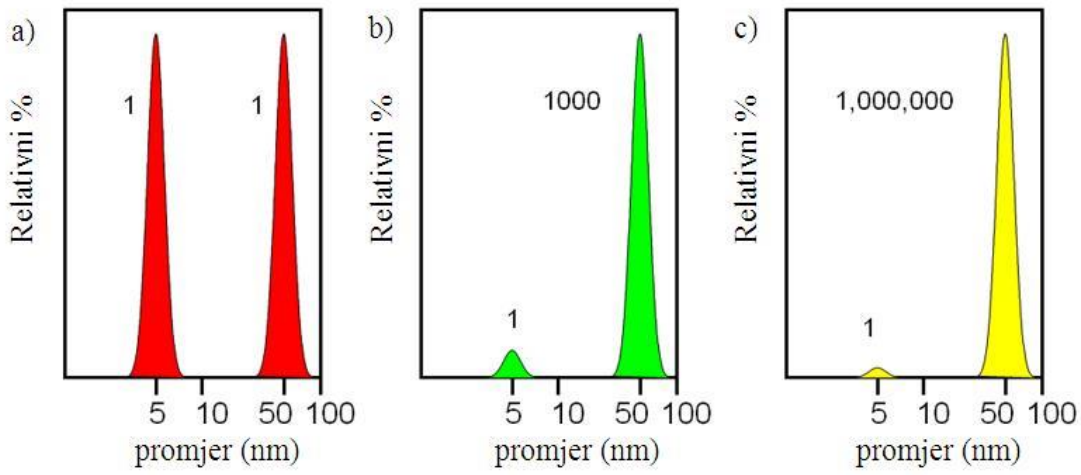


Slika 10: Shematski prikaz uređaja za mjerenje dinamičkog raspršenja svjetlosti[48]

Kada zraka svjetlosti padne na nepomičnu česticu dolazi do raspršenja svjetlosti u svim smjerovima, a raspršena svijetlost ima jednaku frekvenciju kao i upadna zraka. Budući da se u realnom sustavu čestice uvijek gibaju, dolazi do pomaka u frekvenciji, tj. do Dopplerovog efekta. U suspenziji čestica zbog Brownovog gibanja dolazi do pojave nasumičnih fluktuacija raspršene svjetlosti koja pada direktno na fotomultiplikator.[48] Fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti se s vremenom pretvaraju u električni puls iz kojeg se zatim na korelatoru konstruira vremenski ovisna korelacijska funkcija. Iz korelacijske funkcije se zatim različitim algoritmima mogu izračunati veličine čestica. Kumulativna metoda je najčešće korištena metoda u DLS-u pomoću koje se osim raspodjele veličine čestica, računa prosječna *z*-vrijednost veličine čestica (eng. *z-average*) i indeks polidisperznosti (eng. *polidispersity index*, PDI).

Primarne informacije dobivene DLS-om izražene su kao raspodjela veličine po intenzitetu, raspodjela po volumenu ili broju. Takve raspodjele omogućuju bolji uvid u važnost drugog pika i asimetrične raspodjele. Općenito vrijedi: *d* (intenzitet) > *d* (volumen) >

d (broj). Razlika je posljedica toga da dvije čestice različitih veličina jednako doprinose ukupnom broju čestica, ali različito intenzitetu raspršenju, kao što je prikazano na slici 11.



Slika 11: Shematski prikaz raspodjele veličine preko: a) broja, b) volumena i c) intenziteta[48]

Ako se u sustavu nalazi jednak broj čestica veličina 5 i 50 nm, raspodjela po broju daje dva pika omjera 1:1. Kada se raspodjela za isti sustav prikaže po volumenu, omjer se promijeni u 1:1 000 jer je volumen sfere proporcionalan s d^3. Ako se pak prikaže po intenzitetu, omjer pikova je 1:1 000 000 jer je intenzitet proporcionalan d^6.

Prilikom pripreme uzorka potrebno je pripaziti na koncentraciju, medij u kojem se suspendira i prašinu.[48] Raspršenje svjetlosti na česticama trebalo bi biti neovisno. Ako je koncentracija prevelika, može doći do višestrukog raspršenja svjetlosti ili ako su čestice velike, mogu sedimentirati što može uzrokovati krivu interpretaciju rezultata da se prosječni promjer smanjuje s vremenom. Jedan od problema može predstavljati i interakcija među česticama. Odbojne sile dovode do povećanja difuzijskog koeficijenta s koncentracijom, dok privlačne sile poput van der Waalsovih uzrokuju smanjenje difuzijskog koeficijenta s koncentracijom. Također temperatura treba biti stabilna, jer će konvekcija struje u uzorku uzrokovati neslučajne pokrete koji će spriječiti ispravnu interpretaciju veličine.

2.3.4.1. Zeta-potencijal

Zeta-potencijal je fizikalno svojstvo koje je izraženo na bilo kojoj čestici u suspenziji, na površini makromolekule ili materijala. Može se koristiti kako bi se optimizirala formulacija suspenzije, emulzije i otopine proteina, predvidjele interakcije s površinom i optimiziralo stvaranje filma i premaza. Poznavanje zeta-potencijala može skratiti vrijeme potrebno za izradu određene formulacije. Također se može koristiti kao pomoć u predviđanju dugoročne stabilnosti.[50]

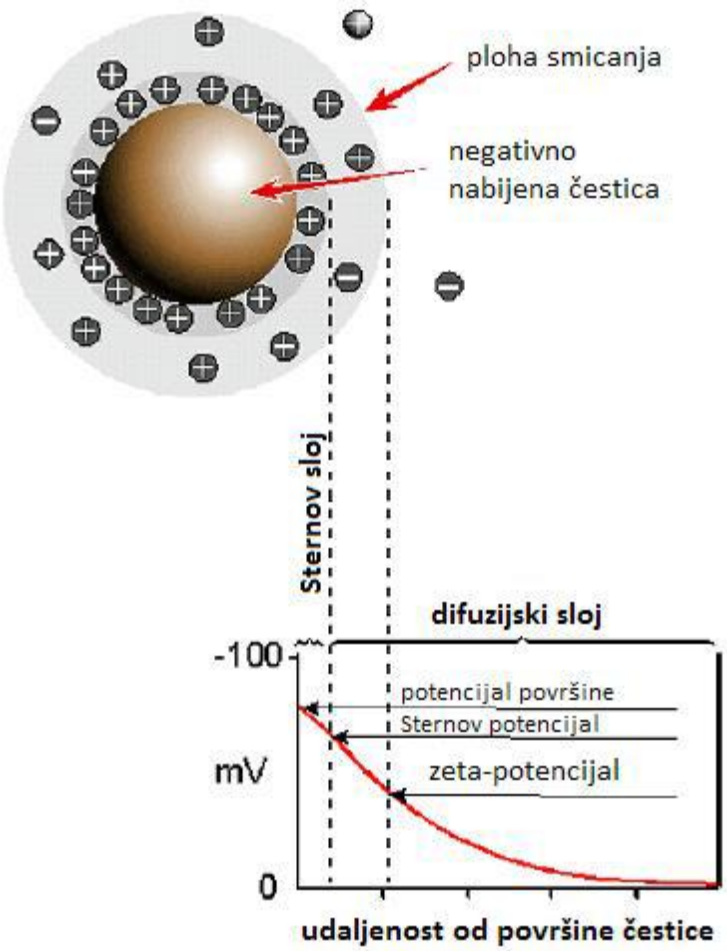
Površina čestica dispergirane faze može biti električki nabijena zbog suviška iona, što je prouzročeno adsorpcijom nekog iona iz otopine ili disocijacijom površinskih skupina. Na slici 12. negativno je nabijena površina čestice čvrste faze. Uz negativno nabijenu površinu nalaze se pozitivno nabijeni ioni u otopini tako da ih je uz samu površinu čestice najviše, a zatim se, s udaljenošću čestice prema ″dubini″ otopine, broj pozitivnih i negativnih iona izjednačava. Opisana pojava naziva se električnim dvoslojem. Neposredno uz česticu se nalazi sloj pozitivnih iona koji čine tzv. Sternov sloj, kojeg je debljina reda veličine iona. Drugi dio čini Gouy-Chapmanov sloj (difuzijski dio dvostrukog sloja). Debljina difuzijskog sloja δ, dana je recipročnom vrijednošću Debye-Hückelova parametra χ:

$$\delta = \frac{1}{\chi} \qquad (4)$$

Iz izraza proizlazi da se debljina sloja smanjuje s koncentracijom elektrolita u sustavu.

Električni dvosloj može se predočiti kao električni kondenzator od dviju suprotno nabijenih površina. Na slici 12. shematizirana je i promjena potencijala u sloju ovisno o udaljenosti od površine čestice. Potencijal površine čestice ψ, maksimalan je, potom naglo pada (Sternov sloj), a zatim eksponecijalno (Gouy-Chapmanov sloj).

Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema elektrodi suprotna predznaka, ta se pojava naziva elektroforetskom pokretljivošću. Zajedno s česticama giba se i Sternov sloj, te dio ″vezanih″ molekula otapala. Može se zamisliti da se zajedno s česticom giba mali volumen medija odijeljen od ostalih molekula vode tzv. ploha smicanja. Potencijal na udaljenosti te plohe smicanja zove se elektrokinetički (ζ) zeta potencijal. ζ-potencijal je važan jer se može relativno lako odrediti iz elektroforetske gibljivosti čestica, a o njemu i naboju na površini dispergirane faze ovisi stabilnost pripremljenih disperzija.[51]



Slika 12: Shematski prikaz zeta-potencijala[52]

Ako sve čestice u suspenziji imaju veliki negativni ili pozitivni zeta-potencijal, onda će težiti međusobnom odbijanju i neće biti tendencije spajanja čestica. Međutim, ako čestice imaju niže vrijednosti zeta-potencijala, onda neće biti sile koja bi spriječila spajanje čestica i flokulaciju.

Općenito, kao razdjelnica izmedu stabilnih i nestabilnih suspenzija je uzeto +30 ili -30 mV. Čestice s zeta-potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV obično se smatraju stabilnima. Ako čestice imaju gustoću veću od disperzivnog sredstva, iako se dispergiraju, one se istalože te tvore tijesno pakiran talog (tj. tvrdi kolač).[50]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i otopine

3.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi, kvercetin, miricetin i miricitrin, *Extrasynthese, Genay, Francuska*, korišteni su bez pročišćavanja. Sve ostale kemikalije su nabavljene od *Sigme-Aldrich* osim ako nije drukčije navedeno.

3.1.2. Priprema magnetskih Fe_3O_4 nanočestica

Magnetitne čestice Fe_3O_4 su pripremljene s mokrom tehnikom formiranja otopine mikro-emulzija.[53,54]

Magnetska mjerenja na nanočesticama su provedena pomoću *Quantum Design MPMS-5T SQUID* magnetometra. Magnetska histereza petlje (eng. *magnetic hysteresis*, M(H)) je mjerena u primjenjenom području u rasponu od 2 T pri tri različite temperature.

3.1.3. Sinteza i karakterizacija magnetskih mesoporoznih Fe_3O_4

Nove mesoporozne magnetske Fe_3O_4 nanočestice su pripremljene prema proceduri u studiju o sintezi i karakterizaciji niza magnetskih nanočestica Fe_3O_4.[55] Ukratko, Fe_3O_4 mesoporozni materijali pokazuju odlična svojstva zbog visoke magnetizacije i velike poroznosti.

3.2 Ugradnja i otpuštanje flavonoida iz nanočestica

Ugradnja flavonoida provedena je miješanjem flavonoida i nanočestica magnetita u različitim masenim omjerima. U ovom radu provedena su istraživanja na tri različita

flavonoida koja su otopljena u smjesi EtOH/H_2O. Korišteni maseni omjeri nanočestica s ugrađenim flavonoidima bio je 10:1 i 6:1.

Učinkovitost ugradnje (eng. *Loading efficiency*, LE) flavonoida (kvercetina, miricetina i/ili miricitrina) izračunata je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$LE = \frac{W_{ugrađeno}}{W_{dodano}} \times 100\%, \quad (5)$$

gdje je $W_{ugrađeno}$ predstavlja masu flavonoida ugrađenih u nanočestice i izračunata je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$W_{ugrađeno} = W_{dodano} - W_{ostatak}, \quad (6)$$

gdje je W_{ukupno} ukupna masa flavonoida koja je dodana za ugradnju, a $W_{ostatak}$ je masa flavonoida koja je ostala u supernatantu nakon odvajanja od nanočestica.

Količina flavonoida u supernatantu je određena spektrofotometrijski primjenom *Varian Cary 100-Bio* snimkom spektra s dvostrukim snopom u rasponu od 190 do 900 nm na temelju njihove apsorpcije pri 370 nm. Kako bi odredili dugotrajno otpuštanje lijeka (23-30 mg) iz nanočestica u *in vitro* uvjetima potrebno je napunjene nanočestice otopiti u PBS/EtOH (3 mL, pH = 7,4) pri 25 °C i miješanju pri 110 r.p.m. pomoću magnetića na magnetskoj miješalici. U različitim vremenima 1 mL supernatanta se skuplja u kivetama, a preostaloj otopini dodaje se ista količina svježe PBS/EtOH smjese. Koncentacija flavonoida u supernatantu je određena pomoću UV/Vis spektrometra *Varian Cary 100 Bio* i snimana je spektrom s dvostrukim laserom. Temperatura u mjerenom odjeljku je kontrolirana i održavala se na 25 °C. Mjerenja su provedena u 10 mm kvarcnim kivetama.

3.3 Metode

3.3.1 UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometar *Varian Cary 100-Bio* je korišten u modu s dvostrukim snopom. Prilikom snimanja temperatura u mjerenom odjeljku je kontrolirana i održavala se na 25 °C. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti duljine puta zrake *d*=10 mm. Pomoću UV/Vis spektrofotometra pratio se udio i ispuštanje lijeka s magnetitnih nanočestica.

3.3.2 FTIR spektroskopija

FTIR analiza nanočestica je provedena korištenjem FTIR spektrometra *ABB Bomem MB 102* opremljen optikom od CsI i DTGS detektorom. Svi spektri snimljeni su nominalnom rezolucijom od 4 cm^{-1}, a broj skenova je iznosio 64. Uzorci su prethodno temeljito osušeni, pomiješaju se s KBr, te se prešaju u male pastile. U slučaju svih spektara analizira se spektralno područje od 400 do 4 000 cm^{-1}. FTIR mjerenjima su analizirane veze između magnetita i ugrađenog flavonoida.

3.3.3 SEM mjerenja

Površinska morfologija nanočestica promatrana je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa *Tescan Vega III Easyprobe*, 20 kV. Skenirajući elektronski mikroskop je korišten kao primarna tehnika kako bi se utvrdila morfologija praznih i napunjenih nanočestica.

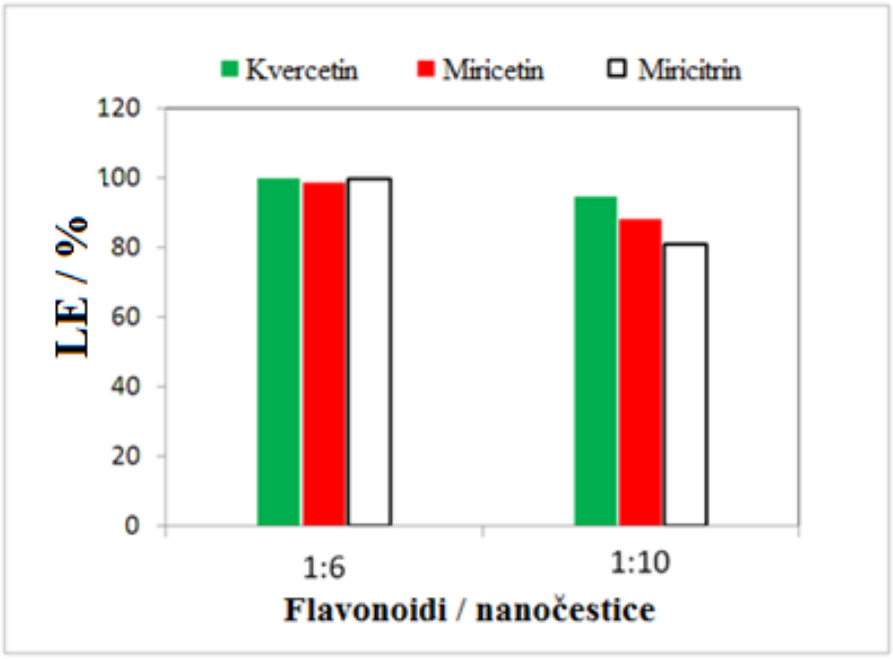
3.3.4 DLS mjerenja

Veličina nanočestica je određena mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti na foton korelacijskom spektrofotometru, *Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK)*, sa ″zelenim″ laserom (λ = 532 nm) pomoću *M3-PALS* tehnike raspršivanjem nanočestica u EtOH//PBS smjesi. Sva mjerenja su provedena na 25,0 ± 0,1 °C. Dobivene korelacijske funkcije su analizirane pomoću *Zetasizer software 6.32* (*Malvern instruments*). Zeta-potencijal se izračunao iz izmjerene pokretljivosti pomoću Henryjeve jednadžbe korištenjem Smoluchowski aproksimacije (f(Ka) = 1,5). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 6 neovisnih mjerenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Učinkovitost ugradnje

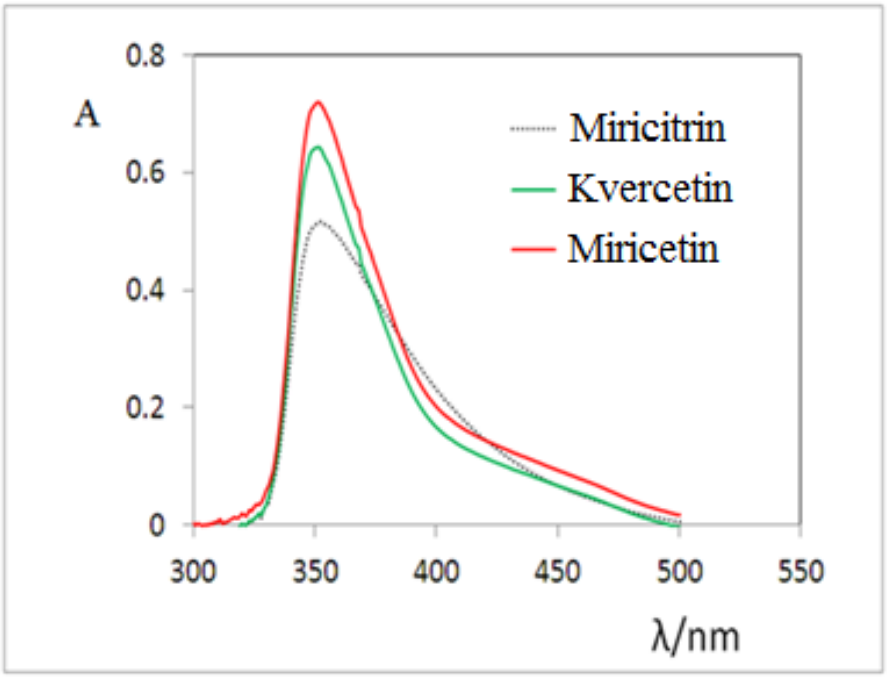
Pripremili smo flavonoid koji je ugrađen u Fe_3O_4 nanočestice u dva masena omjera $m_{flavonoid}/m_{nanočestica}$, 1:6 i 1:10. Na slici 13 prikazana je učinkovitost ugradnje flavonoida pri različitim omjerima flavonoida i nanočestica. Pri masenom omjeru $m_{flavonoid}/m_{nanočestica}$ 1:10 učinkovitost ugradnje flavonoida je bila za kvercetin, 89,53%; miricetin, 78,09%; i miricitrin 62,45%. Bolja učinkovitost ugradnje postigla se pri većem masenom udjelu flavonoida. Pri masenom omjeru $m_{flavonoid}/m_{nanočestica}$ 1:6 se ugradilo više flavonoida. Učinkovitost ugradnje flavonoida je bila za kvercetin, 99,8%; miricetin, 98,72%; i miricitrin, 99,75%. Ovi rezultati potvrđuju da visoka učinkovitost mesoporoznih Fe_3O_4 nanočestica se može poboljšati s količinom dodanih flavonoida.



Slika 13: Učinkovitost ugradnje flavonoida pri masenim omjerima flavonoida i nanočestica 1:10 i 1:6

Ugradnja i otpuštanje kvercetina, miricetina i miricitrina se pratila mjerenjem absorbancije pri valnoj duljini maksimalne apsorbancije. Na slici 14 je prikazana ovisnost

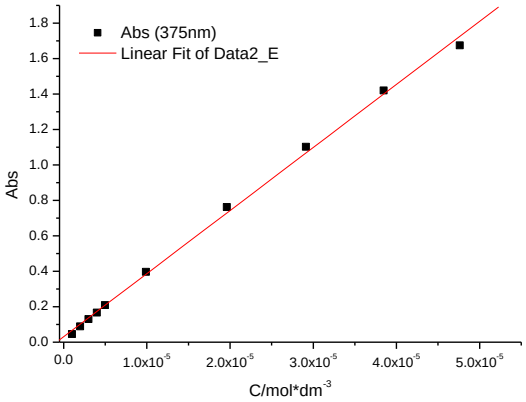
absorbancije flavonoida o valnoj duljini upadnog zračenja. Iz grafičkog prikaza možemo vidjeti da sva tri flavonoida maksimalno absorbiraju pri valnoj duljini 370 nm.



Slika 14: Grafički prikaz ovisnosti absorbancije kvercetina, miricetina i miricitrina o valnoj duljini upadnog zračenja

4.2. Ugradnja i kontrolirano otpuštanje flavonoida

Određivanje koncentracije flavonoida u uzorcima provedeno je upotrebom spektrofotometrijske metode. Za određivanje flavonoida je korištena otopina standarda koja je pripremljena razrjeđivanjem početnih otopina. Prije samog određivanja koncentracije flavonoida potrebno je napraviti baždarni pravac mjerenjem apsorbancije otopina poznate koncentracije na valjnoj duljini od 370 nm. Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji flavonoida dobiven je baždarni pravac za određivanje koncentracije flavonoida iz izmjerene apsorbancije uzorka nepoznate koncentracije flavonoida. Ovakav način određivanja koncentracije smatra se indirektnim. Indirekta metoda određivanja koncentracije flavonoida, podrazumijeva mjerenje absorbancije otopine flavonoida pomoću spektrofotometra, i preračunavanje vrijednosti izmjerene absorbancije u količinu flavonoida pomoću baždarnog pravca. Na slikama 15, 16 i 17 prikazani su baždarni pravci za kvercetin, miricetin i miricitrin.

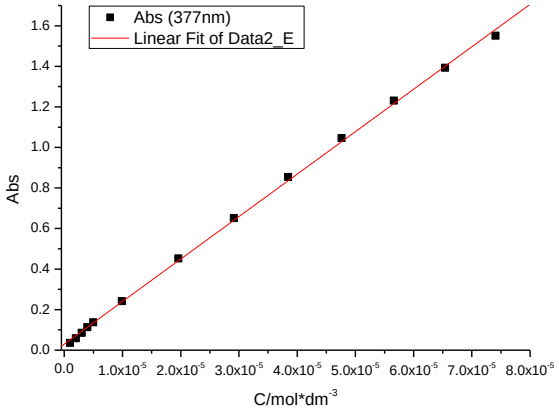


[24.5.2016 14:05 "/Graph1" (2457532)]
Linear Regression for Data2_E:
Y = A + B * X

Parameter	Value	Error
A	0.03136	0.01244
B	35579.60778	548.95164

R	SD	N	P
0.99905	0.0279	10	<0.0001

Slika 15: Baždarni pravac za kvercetin

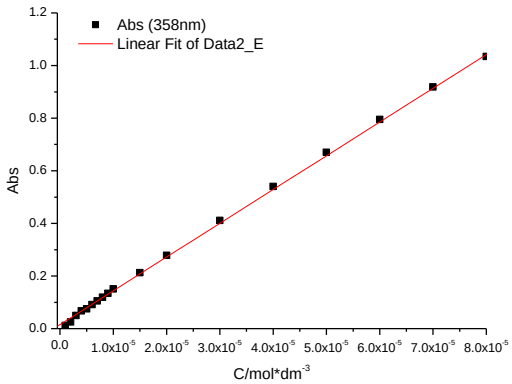


[24.5.2016 13:45 "/Graph1" (2457532)]
Linear Regression for Data2_E:
Y = A + B * X

Parameter	Value	Error
A	0.03074	0.00633
B	20939.38016	169.70681

R	SD	N	P
0.99964	0.01552	13	<0.0001

Slika 16: Baždarni pravac za miricetin



[24.5.2016 14:53 "/Graph1" (2457532)]
Linear Regression for Data2_E:
Y = A + B * X

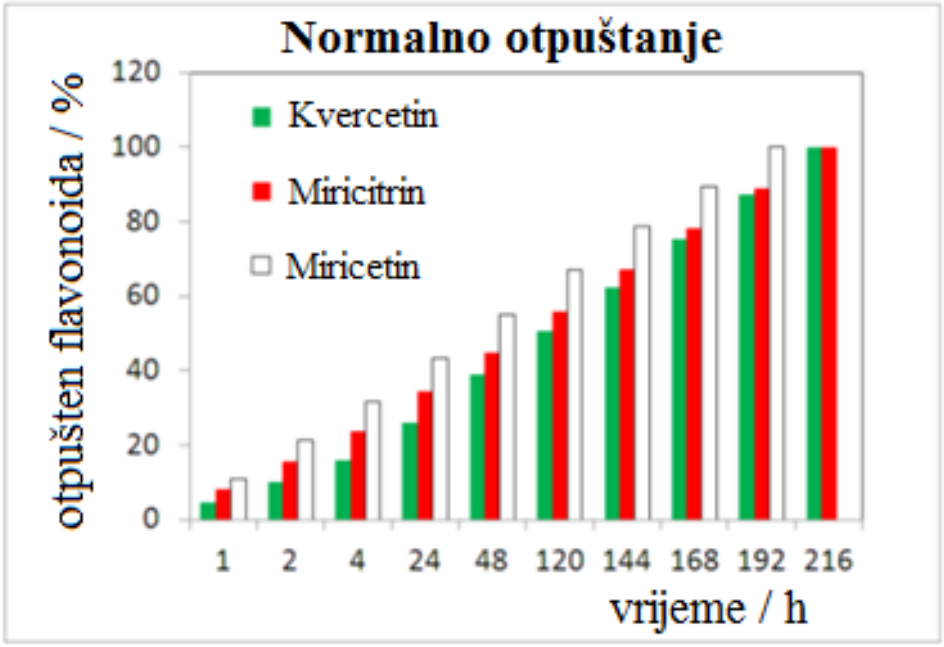
Parameter	Value	Error
A	0.01558	0.00324
B	12829.59477	82.93273

R	SD	N	P
0.99965	0.01027	19	<0.0001

Slika 17: Baždarni pravac za miricitrin

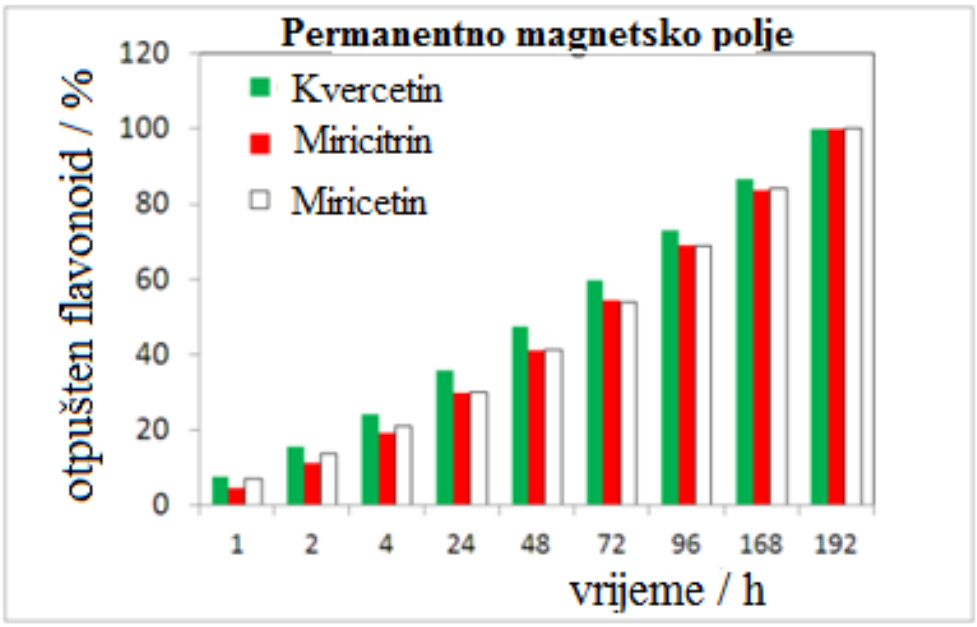
Kontrolirano otpuštanje flavonoida u ovisnosti o vremenu pratilo se u normalnim uvjetima i pri permanentnom i oscilirajućem magnetskom polju. Na prikazanim histogramima na slikama 18, 19 i 20 možemo vidjeti otpuštanje flavonoida tijekom vremena.

Na slici 18 prikazan je kumulativni histogram otpuštanja flavonoida pri normalnim uvjetima. Na magnetsku mješalicu smo stavili otopinu napunjenim nanočesticama i pratili otpuštanje flavonoida tijekom vremena. Nakon prva 4 dana (96 h) otpušteno je 50% flavonoida što je vrlo sporo otpuštanje. Miricitrin se najbolje otpušta jer je više hidrofoban i slabo je vezan za hidrofilnu površinu nanočestica te će zbog toga biti najbrže otpušten. Kvercetin i miricetin više su hidrofilni i zato se oni sporije otpuštaju s nanočestica.



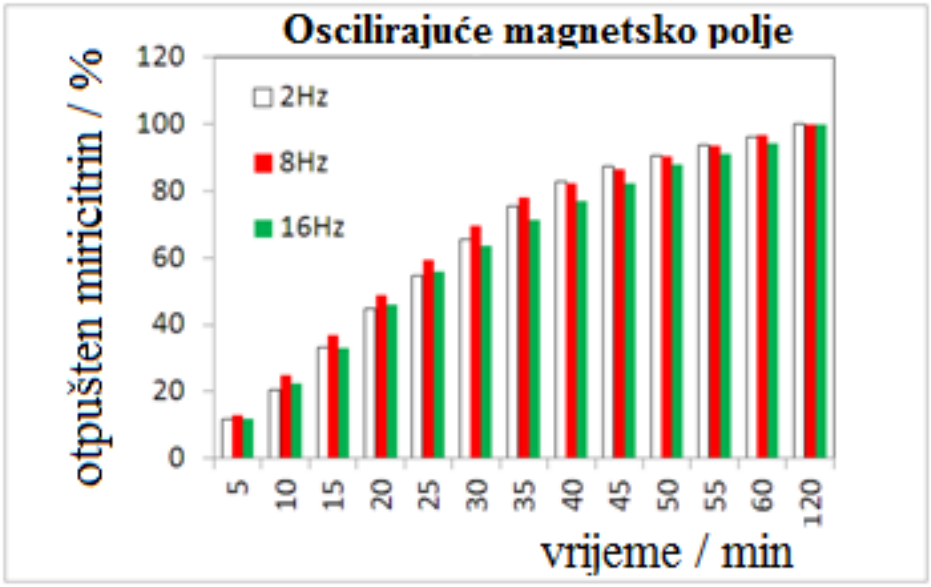
Slika 18: Grafički prikaz kumulativnog otpuštanja flavonoida u normalnim uvjetima u ovisnosti o vremenu

Pratili smo i otpuštanje flavonoida u permanentnom magnetskom polju što je prikazano na slici 19. Iz grafičkog prikaza možemo vidjeti da je nakon 3 dana (72 h) bilo otpušteno 50% flavonoida što je sporije otpuštanje nego pri normalnim uvjetima. Pomoću permanentnog magnetskog polja možemo kontrolirati otpuštanje flavonoida. Također, možemo vidjeti da se kvercetin najbolje otpustio što nije u skladu s našim zaključcima o hidrofilnosti i hidrofobnosti pojedinih flavonoida te to područje treba još dodatno istražiti.



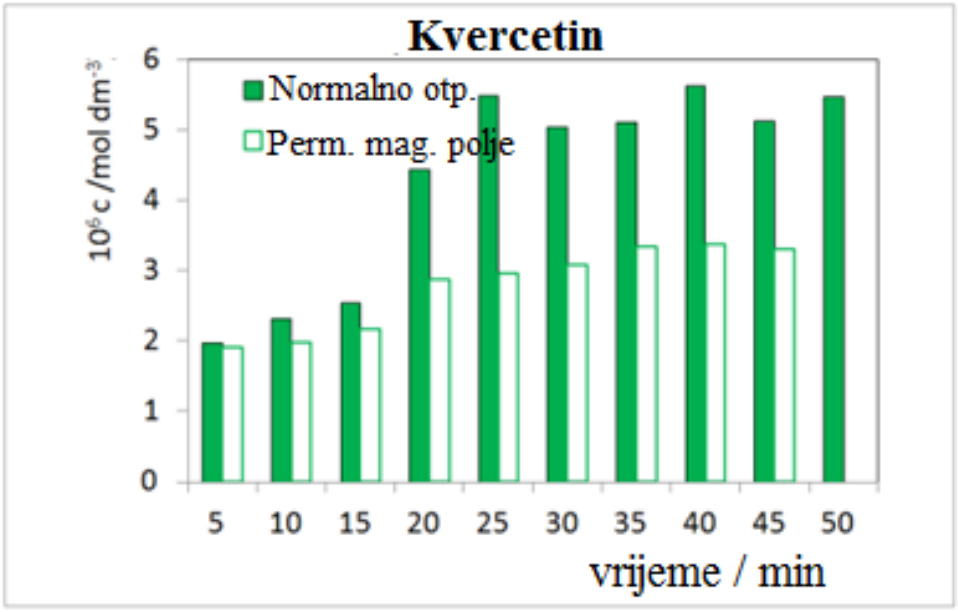
Slika 19: Grafički prikaz kumulativnog otpuštanja flavonoida u permanantnom magnetskom polju u ovisnosti o vremenu

Također, pratilo se otpuštanje flavonoida u oscilirajućem magnetskom polju (slika 20). Primijenjene frekvencije su bile 2, 8 i 16 Hz. Nakon 25 minuta otpustilo se 50% flavonoida što je mnogo brže od prije navedena dva eksperimenta. Magnetske čestice titraju u magnetskom polju i tako dolazi do otpuštanja flavonoida. Najbolje otpuštanje je bilo kod 8 Hz, te možemo zaključiti da je to optimalna oscilacija za najbrže otpuštanje flavonoida iz nanočestica. Kod frekvencije od 16 Hz titracije čestica imaju malu amplitudu što rezultira slabijim otpuštanjem flavonoida. Dakle, djelovanjem vanjskog magnetskog polja možemo utjecati na brzinu otpuštanja flavonoida što je vrlo korisno za primjenu nanočestica u liječenju.



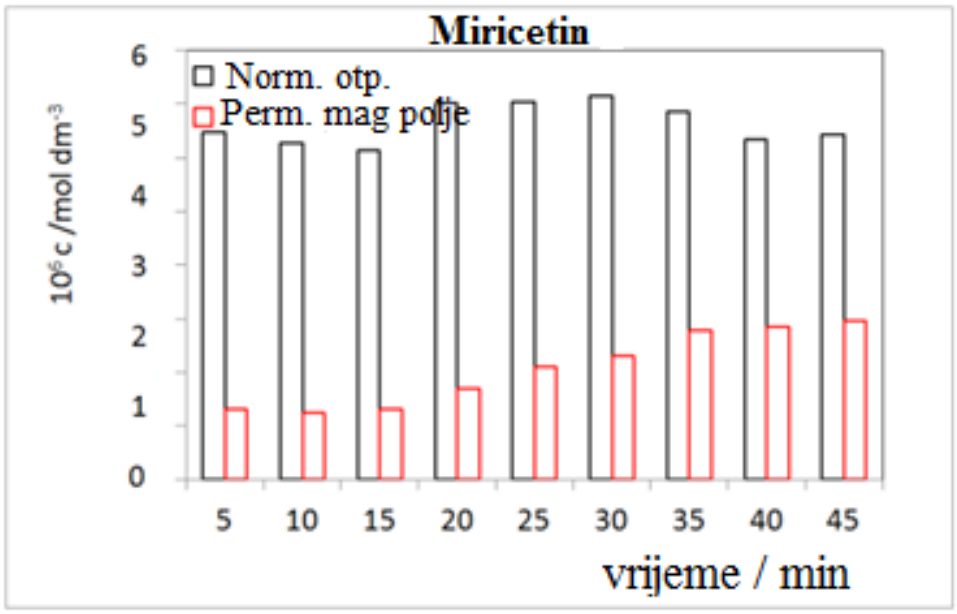
Slika 20: Grafički prikaz kumulativnog otpuštanja miricitrina u oscilirajućem magnetskom polju u ovisnosti o vremenu

Na slikama 21 i 22 su prikazani histogrami ovisnosti koncentracije kvercetina i miricetina o vremenu pri normalnom otpuštanju i pri permanentnom magnetskog polju. Za kvercetin (slika 21) otpuštanje pri normalnim uvjetima ide polako, a nakon 15 minuta otpuštanje je konstantno. Pri permanentnom magnetskom polju otpuštanje je u prvih 10 minuta jednako, a nakon toga se sve više usporava. Flavonoid se brže oslobađao pod normalnim uvjetima, dok je pri permanentnom magnetskom polju otpuštanje bilo mnogo sporije te su konačne koncentracije bile znatno manje.



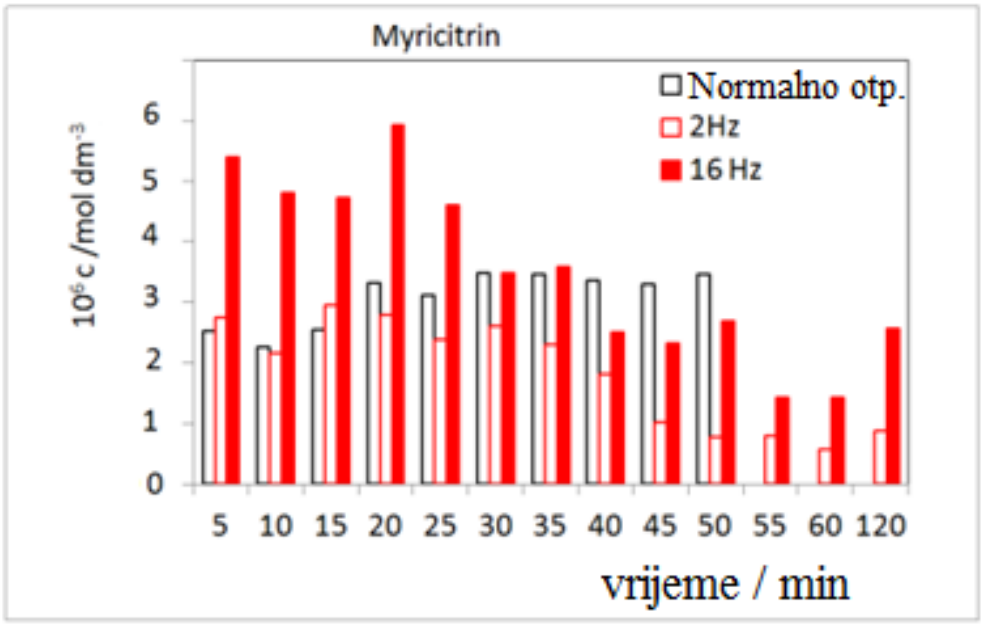
Slika 21: Grafički prikaz koncentracije kvercetina pri normalnom otpuštanju i pri permanentnom magnetskom polju u ovisnosti o vremenu

Otpuštanje miricetina bilo je bolje u normalnim uvjetima, dok u permanentnom magnetskom polju možemo vidjeti puno sporije otpuštanje, oko 4x manje nego pri normalnim uvjetima (slika 22).



Slika 22: Grafički prikaz koncentracije miricetina pri normalnom otpuštanju i pri permanentnom magnetskom polju u ovisnosti o vremenu

Na slici 23 je prikazano otpuštanje miricitrina pri normalnim uvjetima i primijenjenim frekvencijama. Pri frekvencijama od 2 i 16 Hz dolazi do povećanja otpuštanja flavonoida u odnosu na normalno otpuštanje koje je mnogo manje.



Slika 23: Grafički prikaz koncentracije miricirtina pri normalnom otpuštanju i pri oscilirajućem magnetskom polju pri frekvenciji od 2 i 16 Hz u ovisnosti o vremenu

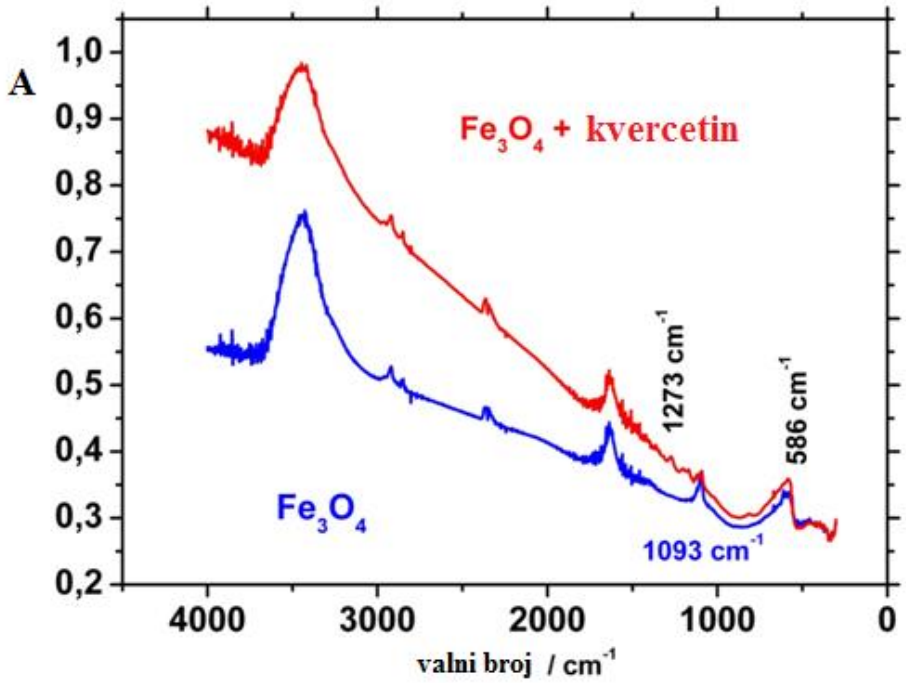
4.3 Karakterizacija praznih i napunjenih magnetskih nanočestica s flavonoidima

FTIR spektroskopijom analizirane su nanočestice kada su u njih ugrađeni flavonoidi. Na slici 24 je prikazan FTIR spektar praznih Fe_3O_4 nanočestica i s ugrađenim kvercetinom. Iz grafičkog prikaza se ne mogu vidjeti vrpce za kvercetin jer je koncentracija flavonoida za IR spektar bila preniska.

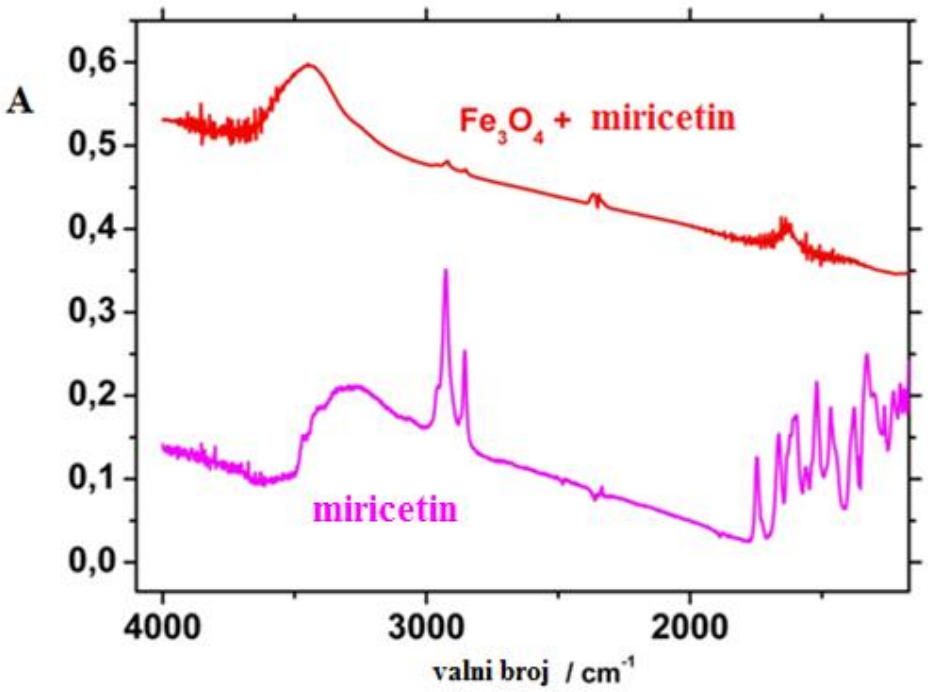
Još se treba istražiti zašto se flavonoidi ne mogu razaznati pri niskim omjerima flavonoida i nanočestica. Jedan od razloga je količina dodanog flavonoida nanočesticama magnetita. Barreto i suradnici[56] su u svome radu prikazali magnetske nanočestice kao novi sustav za kontrolirano otpuštanje kvercetina u kemoterapiji raka. Korišten omjer kvercetina i nanočestica je bio 5:1. Nakon otapanja 100 mg kvercetina u etanolu dodano je 20 mg Fe_3O_4

nanočestica. Zbog veće količine flavonoida na IR spektrima vidjele su se vrpce za kvercetin što u našem slučaju nije bilo moguće zbog premale količine flavonoida.

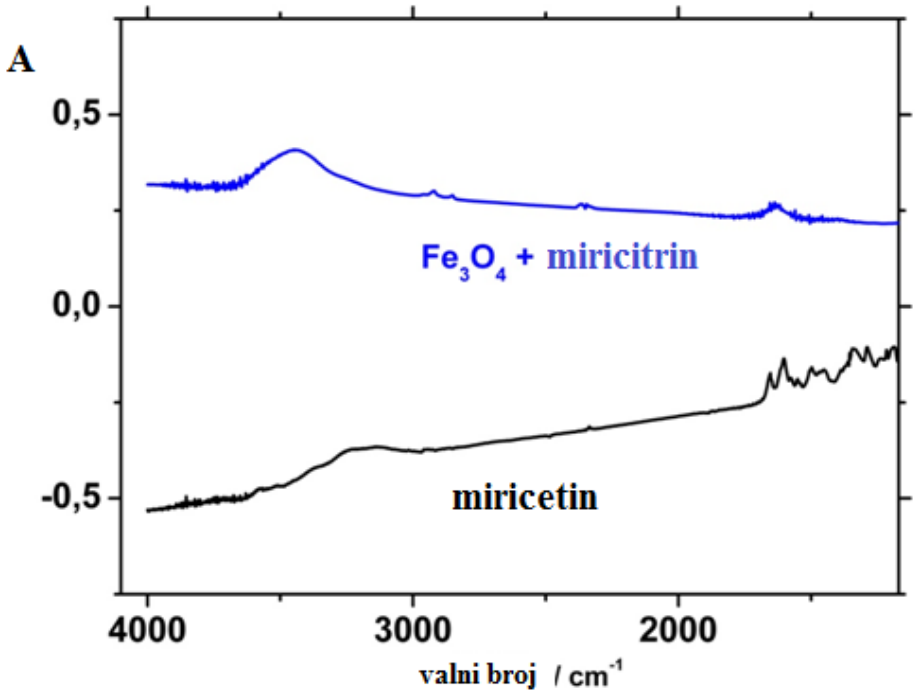
Vrpce za miricetin su prikazane na slici 25 te se one nalaze na oko 3 000 cm^{-1}. Taj valni broj predstavlja aktivno područje za flavonoide. Na slici 26 je prikazana vrpca za miricitrin koja se također ne može razaznati zbog premale količine flavonoida.



Slika 24: FTIR spektar Fe_3O_4 i Fe_3O_4 s ugrađenim kvercetinom



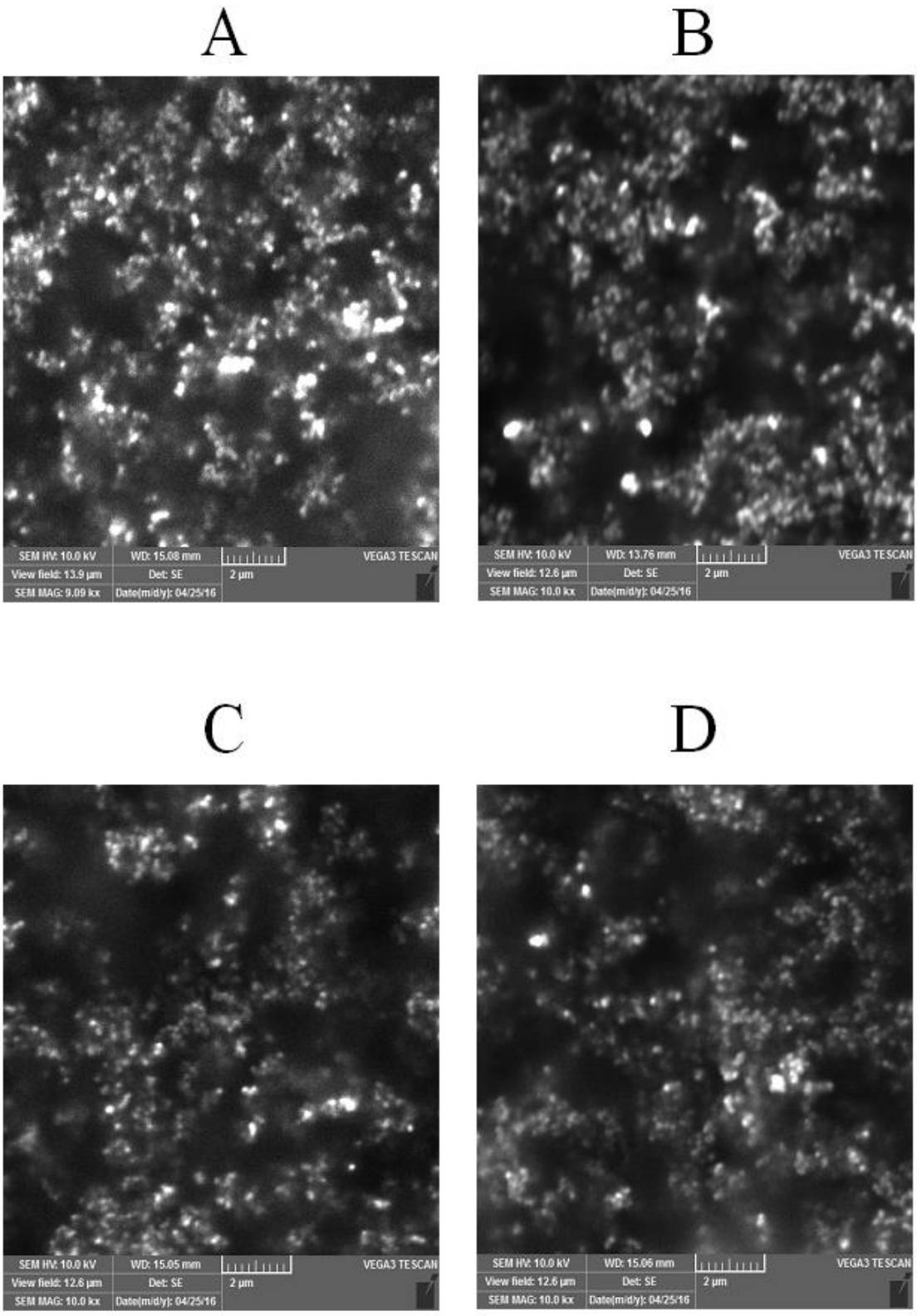
Slika 25: FTIR spektar miricetina i Fe_3O_4 s ugrađenim miricetinom



Slika 26: FTIR spektar miricitrina i Fe_3O_4 s ugrađenim miricitrinom

4.4. Analiza morfologije agregiranih nanočestica

Morfologija Fe_3O_4 nanočestica dobiveni su snimanjem pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Dobivena mikroskopska slika za mesoporozne Fe_3O_4 nanočestice (slika 27) pokazuje mikronske veličine aglomerata. Na slici 27a možemo vidjeti šupljine i neravnine što nam prikazuje prazne nanočestice magnetita. Na sljedećim slikama 27b, 27c i 27d možemo vidjeti napunjene nanočestice kvercetinom, miricetinom i miricitrinom. Površina nanočestica je mnogo zaglađenija nakon što je napunjena flavonoidom za razliku od praznih nanočestica koje predstavljaju vrlo hrapavu površinu. To je jedina razlika koja se može uočiti SEM analizom između praznih i napunjenih nanočestica jer se SEM analizom ne bi trebali vidjeti flavonoidi.

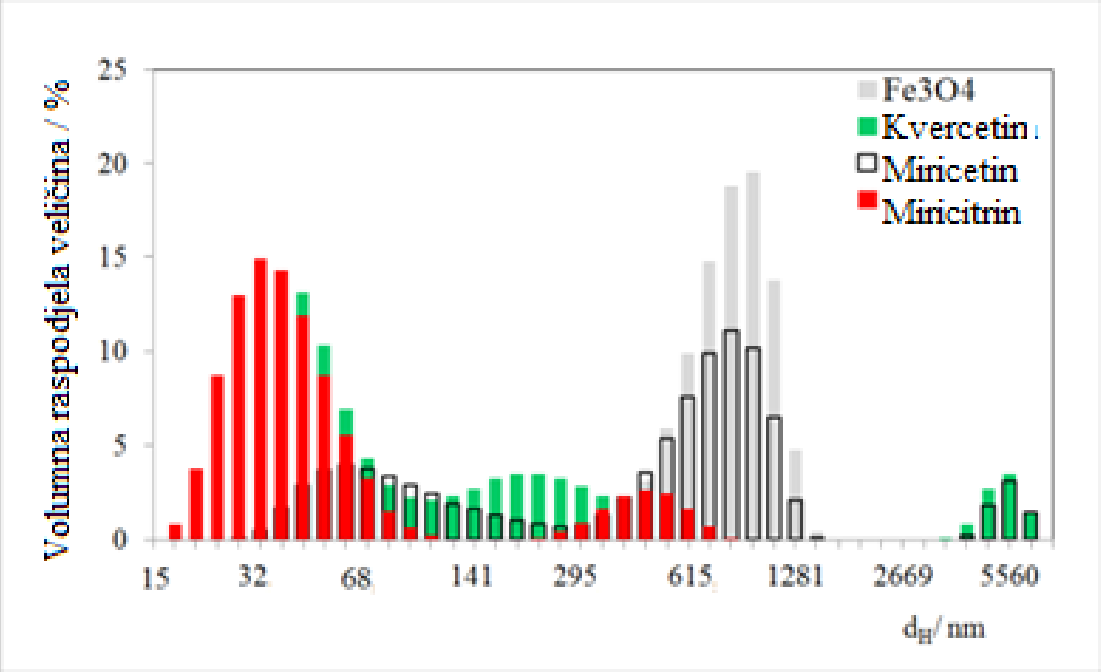


Slika 27: SEM snimka a) nanočestica magnetita, b) nanočestica magnetita s ugrađenim kvercetinom, c) nanočestica magnetita s ugrađenim miricetinom, d) nanočestica magnetita s ugrađenim miricitrinom

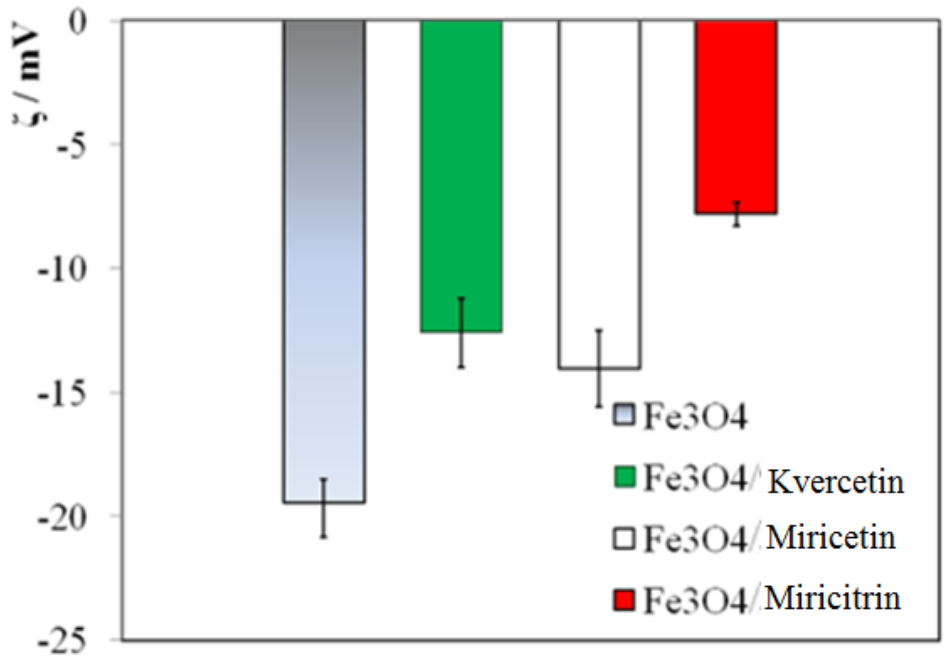
4.5 Raspodjela veličine i zeta potencijal nanočestica u PBS-u

Kako bi se potvrdila koloidna stabilnost nanočestica, izmjerena je suspenzija Fe_3O_4 u PBS puferu. Na slici 28 su prikazani rezultati volumne raspodjele veličine Fe_3O_4 nanočestica u PBS-u pomoću dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Veličina čestica je izmjerena tijekom 96 sati, te je potvrđeno da je veličina agregiranih nanočestica Fe_3O_4 u PBS-u 1 000 nm, a volumna raspodjela agregata Fe_3O_4 napunjena s kvercetinom i miricitrinom je prikazana bimodalnom raspodjelom, a s miricetinom trimodalna.

U slučajevima za kvercetin i miricetin do povećanja prosječne veličine u odnosu na prazne agregate dolazi zbog efektivne adsorpcije kvercetina i miricetina u Fe_3O_4 nanočestice. Kod miricitrina dolazi do manjeg porasta hidrodinamičkih veličina Fe_3O_4 nanočestica što potvrđuje dobru koloidnu stabilnost miricitrina adsorbiranog u Fe_3O_4 nanočestice.



Slika 28: Volumna raspodjela veličine Fe_3O_4 nanočestica u PBS-u



Slika 29: Zeta potencijal Fe_3O_4 i Fe_3O_4 nanočestica s ugrađenim kvercetinom, miricetinom i miricitrinom

Također, provedena su mjerenja zeta potencijala kako bi se mogao proučiti površinski naboj magnetita. Na slici 29 je prikazan zeta potencijal praznih Fe_3O_4 nanočestica i Fe_3O_4 nanočestica napunjenih s kvercetinom, miricetinom i miricitrinom. Prazne Fe_3O_4 nanočestice imaju negativan zeta potencijal i zato možemo za njih reći da imaju veliku stabilnost. Zeta potencijal praznih Fe_3O_4 nanočestica je -19,5 ± 0,9 mV. Nakon ulaska flavonoida u pore i površinu Fe_3O_4 nanočestica njihova stabilnost se smanjuje te zato imaju pozitivniji zeta potencijal. Zeta potencijal nanočestice napunjene kvercetinom je -12,6 ± 1,4 mV, miricetinom je -14,0 ± 1,5 mV i miricitrinom -7,8 ± 0,5 mV. Najveća promjena zeta potencijala je vidljiva kod miricitrina iz čega se može zaključiti da se najviše ugradio što se potvrđuje i iz slike 29.

Razlog za promjenu zeta potencijala iz negativnijeg u manje negativne vrijednosti može biti zbog toga što ima više flavonoida koji je vezan za specifičnu površinu Fe_3O_4 nanočestica. Promjena zeta potencijala potvrđuje uspješnu ugradnju flavonoida na površinu nanočestica.

5. ZAKLJUČAK

Ugradnja flavonoida u Fe_3O_4 nanočestice je pripremljena u dva omjera $m_{flavonoid}/m_{nanočestica}$, 1:6 i 1:10. Učinkovitost ugradnje bila je bolja pri većem masenom udjelu flavonoida što potvrđuje da se visoka učinkovitost ugradnje može podesiti s količinom flavonoida. Snimanjem spektra određena je valna duljina od 370 nm maksimalne apsorpcije zračenja QU, MCE i MCI te je na toj valjnoj duljini praćena ugradnja i otpuštanje flavonoida. Na temelju samo tih rezultata ne može se sa sigurnošću zaključiti gdje se i u kojoj mjeri ugrađuju flavonoidi te se s toga snimanjem UV/Vis spektara i SEM mjerenjima tražila potvrda za ugradnju. Količina flavonoida u supernatantu je određena spektrofotometrijski.

Pratilo se otpuštanje flavonoida pri normalnim uvjetima, u permanentnom i oscilirajućem magnetskom polju s vremenom. Pri normalnim uvjetima flavonoidi se relativno sporo otpuštaju, nakon 4 dana otpušteno 50% flavonoida; dok pod utjecajem permanentnog magnetskog polja možemo malo ubrzati otpuštanje, nakon 3 dana otpušteno 50% flavonoida. Znatno brže otpuštanje je bilo primjenom oscilirajućeg magnetskog polja, nakon 25 minuta otpušteno 50%; a podešavanjem frekvencije se dodatno utječe na brzinu otpuštanja flavonoida. Primjenom optimalne frekvencije osciliranja magnetskog polja od 8 Hz može se postići brzo otpuštanje flavonoida iz nanočestica. Vanjskim magnetskim poljem utječemo na brzinu otpuštanja flavonoida.

Uspoređeno je otpuštanje kvercetina i miricetina pri normalnim uvjetima i pod utjecajem permanentnog magnetskog polja. Kod oba flavonoida je došlo do povećanja prosječne veličine u odnosu na prazne agregate, a brže otpuštanje je bilo pri normalnim uvjetima. Kao najbolji flavonoid za otpuštanje pokazao se miricitrin. MCI je više hidrofoban te je najslabije vezan za hidrofilnu nanočesticu. Zbog toga će se najlakše odvojiti od nanočestice. Kako bi se potvrdila efikasnost ugradnje MCI provedena su mjerenja zeta potencijala. Ugradnjom MCI došlo je do malog porasta hidrodinamičkih polumjera i najveće promjene zeta potencijala što je potvrda dobre stabilnosti i najbolje ugradnje. Prazne Fe_3O_4 nanočestice imaju negativan zeta potencijal i zato pokazuju veliku stabilnost. Izmjerena je veličina nakupina Fe_3O_4 u PBS-u od 1000 nm, a volumna raspodjela agregata Fe_3O_4 napunjena s kvercetinom i miricitrinom je prikazana bimodalnom raspodjelom, a s miricetinom trimodalna.

FTIR analizom nismo uspjeli vidjeti vrpce za flavonoide te se to treba dodatno istražiti. Jedna od pretpostavki je premala koncentracija flavonoida korištena tijekom eksperimenta.

SEM oslikavanjem i analizom dobivenih snimaka potvrđena je ugradnja QU, MCE i MCI u Fe_3O_4 nanočestice zbog promjene u morfologiji i veličini čestica.

Flavonoidi QU, MCE i MCI pokazuju značajna terapeutska svojstva te bi se u budućnosti mogli koristiti u liječenju raznih bolesti, primjerice Parkinsonove bolesti, dijabetesa i dr. zbog čega su vrlo važna daljnja istraživanja njihovog utjecaja.

6. LITERATURA

1. Álvarez-Diduk R, Ramírez-Silva MT, Galano A, MerkoçI A. Deprotonation mechanism and acidity constants in aqueous solution od flavonol: a combined experimental and theoretical study. J. Phys. Chem. *B* 117 (2013) 12347−12359.
2. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal (2013) 1-16.
3. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arh. Hig. Rada Toksikol. 55 (2004) 279-290.
4. Bansal T, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 12 (2009) 46–78.
5. Jazvinšćak Jembrek M, Vuković L, Puhović J, Erhardt J, Oršolić N. Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. J. Mol. Neurosci. 47 (2012) 286–299
6. Zhu X, Jia YH. Inhibition of catechol-o-methyltransferase (COMT) by myricetin, dihydromyricetin, and myricitrin. Pharmazie 69 (2014) 183–186.
7. Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. J. Nutr. 135 (2005) 2291-2294.
8. Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. Phytother. Res. 15 (2001) 39−43.
9. Martins HFP, Leal JP, Fernandez MT, Lopes VHC, Cordeiro MNDS. Toward the prediction of the activity of antioxidants: experimental and theoretical study of the gas-phase acidities of flavonoids. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15 (2004) 848−861.
10. Álvarez-Diduk R, Ramírez-Silva MT, Galano A, MerkoçI A. Deprotonation mechanism and acidity constants in aqueous solution of flavonol: a combined experimental and theoretical study. J. Phys. Chem. *B* 117 (2013) 12347−12359.
11. Josipović P, Oršolić N. Citotoksičnost polifenolnih/flavonoidnih spojeva u kulturi leukemijskih stanica. Arh. Hig. Rada Toksikol. 59 (2008) 299-308.
12. Wiley AJ & Sons. Plant phenolics and human health. Copyright. Hoboken. 2010. str. 5.

13. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Letters 416 (1997) 123-129.
14. Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. Biochem. Pharmacol. 44 (1992) 1603-1608.
15. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vander Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. J. Nat. Prod. 61 (1998) 71-76.
16. Mulvihill EE, Huff MW. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular helth. Can. J. Cardiol. 26 (2010) 17A-21A.
17. Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. Curr. Opin. Lipidol. 16(1) (2005) 77-84.
18. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chem. 89 (2005) 191-198.
19. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, Erk MJ, Wielinga PY, Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. Atherosclerosis 218 (2011) 44-52.
20. Tabassum N, Ahmad F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. Pharmacogn. Rev. 5 (2011) 30-40.
21. Koo SI, Noh SK. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. J. Natur. Biochem. 18 (2007) 179-183.
22. Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY. Antiartherosclerotic effects of plant flavonoids. BioMed. Res. Int. 2014 (2014) 11.
23. Josipović P, Oršolić N. Citotoksičnost polifenolnih/flavonoidnih spojeva u kulturi leukemijskih stanica. Arh. Hig. Rada Toksikol. 59 (2008) 299-308.
24. http://www.phytochemicals.info/
25. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. Elsevier Sci. Ltd. 19 (1995) 481-486.
26. Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CAL, Calixto JB, Santos ARS. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. J. Pharmacol. Exp. Ther. 316 (2005) 789-796.

27. Edenharder R, Grünhage D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* Ta 102. Mutat. Res. 540 (2003) 1-18.
28. Sun G, Qin M, Ye J, Pan R, Meng X, Wang M, Luo Y, Li Z, Wang H, Sun X. inhibitory effects of myricitrin on oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis in ApoE-/-mice. Toxicol. Appl. Pharm. 13 (2013)
29. Durić-Cirkveni A. Vitamini iskre života i čuvari zdravlja. ARK-press. Zagreb. 1995. str. 66-67.
30. Ivanković M. Nanomaterijali i nanoproizvodi-mogućnosti i rizici. Polimeri 1 (2011) 23-28.
31. http://www.eho.com.hr/news/nanomaterijali/6120.aspx
32. Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environ. Poll. 150 (2007) 5-22.
33. Paul BK, Moulik SP. Uses and applications of microemulsions. Curr. Sci. 80 (2001) 990-1001.
34. Schwuger MJ, Stickdom K. Microemulsions in technical processes. Chem. Rec. 95 (1995) 849-864.
35. Malmsten M. Surfactants and polymers in drug delivery. Poglavlje 5. microemulsions, Marcel Dekker, New York, Basel. 2002..
36. Kovačević V. Nanočestice i žive stanice. Polimeri 2 (2009) 76-82.
37. https://hr.wikipedia.org/wiki/Magnetit
38. Blaney L. Magnetite (Fe_3O_4): Properties, synthesis, and applications. Lehigh Review 15 (2007)
39. Fizika nanomaterijala, u Posebni , novi, nanomaterijali i njihova svojstva.
40. Jurkin T, Gotić M. Mikroemulzijska sinteza nanočestica. Kem. Ind. 62 (2013) 401-415.
41. http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetcs/Spectrophotometry
42. Horvat AJM, Margeta K. Instrumentalna analiza. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Zagreb. 2009. Str. 23.
43. Popović Z. Infracrvena spektroskopija. Prirodoslovno matematički fakultet. Zagreb. 1999. Str. 2.
44. http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf
45. Gregory J. Particles in water: properties and processes. CRC Press, Taylor & Francis Group. London. 2006.
46. www.nanoscience.com

47. Mršić G, Žugaj S. Analiza GRS čestica upotrebom elektronskog mikroskopa (SEM/EDX). Polic. sigur. Zagreb. 2007. str. 179-200.
48. Kaszuba M. Zetasizer nano series and HPPS training course. Malvern. 2012.
49. Hassan PA, Rana S, Verma G. Langmuir 31 (2015) 3-12.
50. www.malvern.com
51. Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Školska knjiga. Zagreb. 1998. str. 29-30.
52. www.pharmaceuticalonline.com
53. Mustapić M, Pajić D, Novosel N, Babić E, Zadro K, Cindrić M, Horvat J, Skoko Z, Bijelić M, Shcherbakov A. Croat. Chem. Acta 83 (2010) 275e282
54. Nakayama Y, Mustapić M, Ebrahimian H, WagnerP, Kim JH, Md Sh, Hossain Al, Horvat J, Martinac B. Eur. Biophys. J. 44 (2015) 647e654.
55. Mustapić M, Shahriar Al Hossain Md, Horvat J, Wagner P, Mitchell DRG, Ho Kim J, Alici G, Nakayama Y, Martinac B. Controlled delivery of drugs adsorbed onto porous Fe O structures 3 4 by application of AC/DC magnetic fields. Micropor.Mesopor. Mat. 226 (2016) 243-250.
56. Barreto ACH, Santiago VR, Mazzetto SE, Denardin JC, Lavín R, Mele G, Ribeiro MENP, Vieira IGP, Gonçalves, Ricardo NMPS, Fechine PBA. Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy. J. Nanopart. Res. 13 (2011) 6545-6553.

7. POPIS KRATICA

COMT	katehol-*O*-metiltransferaza
CRT	katodna cijev (eng. *Cathode Ray Tube-CRT*)
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (eng. *dynamic light scattering*)
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. *infred spectroscopy with fouriers transformation*)
IR	infracrvena spektroskopija (eng. *infrared spectroscopy*)
LDL	lipoprotein niske gustoće (eng. *low-density lipoprotein*)
LE	učinkovitost ugradnje (eng. *loading efficiency*)
MCE	miricetin (eng. *myricetin*)
MCI	miricitrin (eng. *myricitrin*)
M(H)	magnetska histereza (eng. *magnetic hysteresis*)
NO	dušikov oksid (eng. *nitrous oxide*)
QU	kvercetin (eng. *quercetin*)
PBS	fosfatni pufer (eng. *phosphate buffer saline*)
PDI	indeks polidisperznosti (eng. *polidispersity index*)
r.p.m.	mjera frekvencije rotiranja, broj rotiranja oko fiksne osi u minuti (eng. *revolutions per minute*)
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (eng. *scanning electron microscopy*)
UV/Vis	Ultravioletna-vidljiva spektroskopija (eng. *ultraviolet spectroscopy*)

ŽIVOTOPIS

Morana Drušković rođena je 21. ožujka 1992. u Zagrebu. Pohađala je osnovnu školu Bogumila Tonija nakon koje je upisala Opću gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Samoboru. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Primijenjena kemija upisala je 2010. godine u Zagrebu. Završni rad, na temu *Sinteza estera viših masnih kiselina u nekonvencionalnim otapalima* je radila na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Zvjezdane Findrik Blažević. Stručnu praksu je obavila u Plivi.

Diplomski studij Primijenjene kemije (modul Specifični materijali i napredne tehnologije) upisuje na istom fakultetu 2014. godine.