

# Ugradnja flavonoida u mesoporozne magnetske nanočestice i utjecaj magnetskog polja na kinetiku njihovog otpuštanja

---

Punčec, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:149:021927>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marina Punčec

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marina Punčec

UGRADNJA FLAVONOIDA U MESOPOROZNE  
NANOČESTICE I UTJECAJ NA KINETIKU NJIHOVOG  
OTPUŠTANJA

## ZAVRŠNI RAD

**Voditelj rada:** doc. dr. sc. Davor Dolar

**Neposredni voditelj rada:** dr. sc. Suzana Šegota, viši znanstveni suradnik IRB-a

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

doc. dr. sc. Davor Dolar,

dr.sc. Suzana Šegota

prof. dr. sc. Jelena Macan

**Zagreb, rujan 2018.**

*Ovaj rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, Zavod za fizičku kemiju, u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju, akademske godine 2017./2018. i financiran u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-06-2016-8415 "Zaštitni mehanizmi i učinci flavonoida ugrađenih u nanonosачe u modelnim membranama i neuronima", voditelj dr.sc.*

*Suzana Šegota.*

## SAŽETAK

Preparacija mesoporoznih magnetitnih ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanočestica postignuta je modificiranom solvotermalnom reakcijom amonijevog acetata, željezovog triklorid heksahidrata i polietilen glikola u etilen glikolu. Njihova fizikalno-kemijska, strukturna, magnetska i morfološka karakterizacija provedena je rendgenskom difrakcijom praha, pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), elektroforetskim raspršenjem svjetlosti (ELS), Brunauer-Emmet-Teller (BET) analizom, supravodljivim kvantnim interferometrom (SQUID) i infracrvenom spektroskopijom (FTIR).

Flavonoidi kvercetin, miricetin i miricitrin su ugrađeni u pripremljene mesoporozne magnetitne nanočestice. Istražen je utjecaj vanjskih magnetskih polja, permanentnog i oscilirajućeg, na kinetiku otpuštanja flavonoida. Pomoću generatora izmjenične struje spojenog na zavojnicu generirano je oscilirajuće magnetsko polje željenih frekvencija (0,1 Hz, 1,0 Hz i 10 Hz). Za izvor permanentnog magnetskog polja poslužio je magnet jakosti 0,19 T. Koncentracija otpuštenih flavonoida u zadanim vremenima pratila se ultraljubičastom-vidljivom (UV/VIS) spektroskopijom.

Ustanovljeno je da nanočestice imaju pravilnu kristaliničnu strukturu s veličinom kristalita od 32 nm. S obzirom na specifičnu površinu od  $16,69 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , promjera pora 25,93 nm i volumena pora  $0,106 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  sintetizirane nanočestice pripadaju skupini mesoporoznih nanočestica. Da bi se mogle primijeniti u oscilirajućem magnetskom polju, nanočestice magnetita moraju biti superparamagnetične, što je potvrđeno mjerenjem magnetizacije zasićenja. Pripremljene nanočestice pokazuju dobar model za ugradnju flavonoida, pri čemu se kvercetin najbolje ugrađuje od izabranih flavonoida. S obzirom na strukturu flavonoida to je u skladu s očekivanim. Miricetin, najhidrofobniji flavonoid od korištenih, te miricitrin s dodatnom ramnozom zbog steričkih faktora slabije se ugrađuju u nanočestice. Otpuštanje flavonoida iz magnetitnih nanočestica pod djelovanjem permanentnog i oscilirajućeg magnetskog polja je najizraženije pri frekvenciji osciliranja od 10 Hz.

**Ključne riječi:** magnetitne nanočestice, flavonoidi, kvercetin, miricetin, miricitrin, mesoporoznost, superparamagnetičnost

## Summary:

Preparation of mesoporous magnetic nanoparticles was achieved through modified solvothermal reaction from iron(III) chloride hexahydrate, ammonium acetate, polyethylene glycol and ethylene glycol that were all dissolved in ethylene glycol. Their physical-chemical, structural, magnetic and morphological characterization was performed by X-ray powder diffraction, scanning electron microscopy (SEM), electrophoretic light scattering (ELS), Brunauer-Emmet-Teller (BET) analysis, superconductive quantum interferometer (SQUID) and infrared spectroscopy (FTIR).

Flavonoids quercetin, miricetin and miricitrin were incorporated into prepared mesoporous magnetite nanoparticles. We examined the influence of the external and oscillating external magnetic fields on the kinetics of the release of flavonoids. The oscillating magnetic field of the desired frequencies (0.1 Hz, 1.0 Hz and 10 Hz) was generated by the alternating current generator connected to the coil. For the source of the permanent magnetic field, a magnitude 0.19 T was used. The concentration of the released flavonoids at predetermined time was monitored by ultraviolet/visible (UV / VIS) spectroscopy.

It has been found that nanoparticles have a proper crystalline structure with a crystal size of 32 nm. Given the specific surface area of  $16.69 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , pore diameter 25.93 nm and pore volume  $0.106 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  synthesized nanoparticles belong to the group of mesoporous nanoparticles. To be applied in an oscillating magnetic field, nanoparticles of magnetite must be superparamagnetic, as confirmed by the measurement of saturation magnetization. The prepared nanoparticles exhibit a good model for incorporating flavonoids, whereby the quercetin is best fitted from the chosen flavonoids. Given the structure of flavonoids this is in line with the expected. Miricetin, the most hydrophobic flavonoid of the used, and miricitrin with additional rhamnose due to steric factors, are poorly incorporated into nanoparticles. Release of flavonoids from magnetite nanoparticles under the action of permanent and oscillating magnetic fields is most pronounced at the oscillation frequency of 10 Hz.

**Key words:** magnetite nanoparticles, flavonoids, quercetin, myricetin, myricitrin, mesoporosity, superparamagnetism

# SADRŽAJ

|  | Stranica |
|--|----------|
| SAŽETAK .....  | I        |
| SUMMARY .....  | II       |
| 1. UVOD .....  | 1        |
| 2. TEORIJSKI DIO .....   | 2        |
| 2.1. Magnetitne nanočestice .....  | 2        |
| 2.2. Flavonoidi .....  | 4        |
| 2.2.1. Kvercetin .....   | 5        |
| 2.2.2. Miricetin .....   | 6        |
| 2.2.3. Miricitrin .....  | 7        |
| 2.3. Oksidacijski stres i slobodni radikali .....                          | 8        |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....   | 9        |
| 3.1. Materijali i kemikalije .....   | 9        |
| 3.2. Preparacija nanočestica .....   | 9        |
| 3.3. Karakterizacija nanočestica .....                                     | 11       |
| 3.3.1. Rendgenska difrakcija praha (XRPD) .....                            | 11       |
| 3.3.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) .....                      | 11       |
| 3.3.3. Brunauer-Emmet-Teller analiza (BET) .....                           | 11       |
| 3.3.4. Magnetska mjerenja .....  | 12       |
| 3.3.5. Infracrvena spektroskopija Fourierovom transformacijom (FTIR) ..... | 12       |
| 3.3.6. Zeta potencijal ( $\zeta$ ) .....                                   | 12       |
| 3.4. Ugradnja flavonoida u nanočestice .....                               | 13       |
| 3.5. Određivanje kinetike otpuštanja flavonoida .....                      | 14       |
| 4. REZULTATI .....   | 15       |
| 4.1. XRPD rezultati za magnetitne nanočestice .....                        | 15       |
| 4.2. Rezultati SEM analize za magnetitne nanočestice .....                 | 15       |
| 4.3. Rezultati BET analize magnetitnih nanočestica .....                   | 18       |
| 4.4. Rezultati magnetskih mjerenja .....                                   | 19       |
| 4.5. Rezultati FTIR analize magnetitnih nanočestica .....                  | 19       |
| 4.6. Rezultati mjerenja zeta potencijala .....                             | 19       |
| 4.7. Rezultati ugradnje magnetitnih nanočestica flavonoidima .....         | 21       |
| 4.8. Rezultati otpuštanja flavonoida iz magnetitnih nanočestica .....      | 23       |
| 4.9. Rezultati FTIR analize nanočestica s ugrađenim flavonoidima .....     | 27       |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 5. ZAKLJUČAK.....     | 28 |
| 6. POPIS SIMBOLA..... | 29 |
| 7. LITERATURA.....    | 30 |
| 8. ŽIVOTOPIS.....     | 34 |



## 1. UVOD

Flavonoidi su skupina prirodnih derivata benzo- $\gamma$ -pirana prisutnih kod biljaka i najčešće dolaze kao glikozidi. Pokazuju mnoštvo bioloških efekata koji uključuju antioksidativno djelovanje kod lipidne oksidacije zbog mogućnosti inaktiviranja slobodnih radikala i stvaranja kelata s metalima<sup>[1]</sup>. Upotreba flavonoida je ograničena zbog njihove slabe topljivosti u vodi, odnosno velike hidrofobnosti i kemijske nestabilnosti unutar fizioloških uvjeta (temperatura, svjetlost, pH)<sup>[2]</sup>. U novije vrijeme, magnetske mesoporozne Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočestice privlače pažnju kao gotovo idealni sustavi za isporuku biološki aktivnih molekula. Njihova veličina i površinska svojstva mogu se učinkovito kontrolirati, što omogućuje produženo otpuštanje aktivnih tvari<sup>[3]</sup>. Zbog njihove velike aktivne površine i velikog volumena pora mogu služiti kao nosači različitim vrstama molekula s velikim kapacitetom ugradnje. Osim toga, pružaju i odličnu fizičko-kemijsku zaštitu od razgradnje u fiziološkim uvjetima kakvi vladaju prilikom endogenih enzimatskih aktivnosti<sup>[4]</sup>.

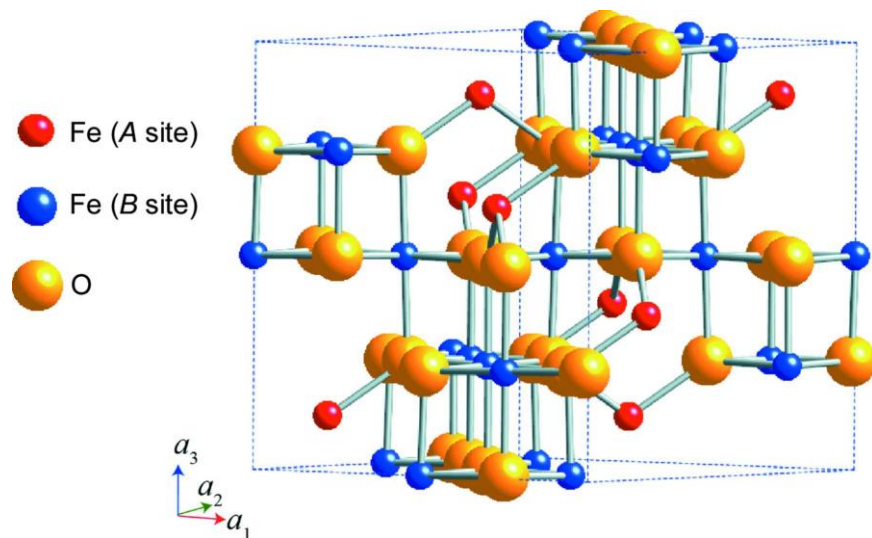
U ovom radu korišteni su flavonoidi kvercetin, miricetin i miricitrin koji su ugrađeni u mesoporozne magnetitne nanočestice. Cilj je bio odrediti njihovo otpuštanje iz nanočestica u vanjskim magnetskim poljima, permanentnom i oscilirajućem polju te ga usporediti s njihovim otpuštanjem bez utjecaja magnetskog polja.

Za određivanje koncentracije otpuštenih flavonoida u vremenu koristila se ultraljubičasta/vidljiva (UV/VIS) spektrofotometrija. Karakterizacija nanočestica provedena je magnetskim mjerenjima, rendgenskom strukturnom analizom, pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), te elektroforetskim raspršenjem svjetla mjerenjem zeta potencijala, Brunauer-Emmet-Teller (BET) analizom i infracrvenom spektroskopijom (FTIR). Karakterizacija nanočestica s ugrađenim flavonoidima provedena je mjerenjem zeta potencijala i FTIR analizom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Magnetitne nanočestice

Željezovi oksidi su uobičajni spojevi koji se često nalaze u prirodi kao oksidne rude te se mogu sintetizirati u laboratoriju. Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ima strukturu inverznog spinela gdje se nalaze 32 oksid-iona, 8  $\text{Fe}^{2+}$ -iona u oktaedarskim šupljinama, 16  $\text{Fe}^{3+}$ -iona od kojih se 8 nalazi u tetraedarskim, 8 u oktaedarskim šupljinama<sup>[5]</sup>.



Slika 1. Kristalna struktura magnetita<sup>[6]</sup>

Idealni magnetski materijal za bioaplikaciju treba posjedovati prigodnu površinu koja će maksimizirati kapacitet punjenja željene tvari, brzi magnetski odziv radi brze separacije, odličnu biokompatibilnost i trebalo bi izbjeći bilokakav citotoksični efekt. Veliki napredak je postignut u sintezi magnetskih nanočestica s kontrolom veličine i oblika pomoću toplinske razgradnje. Ti mali magnetski nanokristali imaju zadovoljavajuću specifičnu površinu ali slab magnetski odziv ograničava njihovu primjenu<sup>[7]</sup>. Budući da nanočestice moraju biti stabilne u biološkim medijima, potrebno ih je funkcionalizirati. Jedan od često korištenih stabilizatora koji je biokompatibilan jest polietilen glikol, netoksičan, neimunogen, neantigen polimer otporan na proteine<sup>[8]</sup>. Solvotermalnom reakcijom uz polietilen glikol nastaju stabilne magnetne nanočestice koje posjeduju dobar magnetski odziv, visok kapacitet ugradnje, veliku specifičnu površinu, povećanu koloidnu stabilnost, prominentnu biokompatibilnost te se mogu razgraditi pomoću kiselina. Takve magnetne nanočestice su od velikog značaja kao nosači za dijagnostiku i terapijsku aplikaciju kod lijekova protiv raka pluća, jajnika, dojke i karcinoma

mozga. U ovom radu poslužit će kao nanonosaci flavonoida koji su po svojoj prirodi netopljivi u vodi.

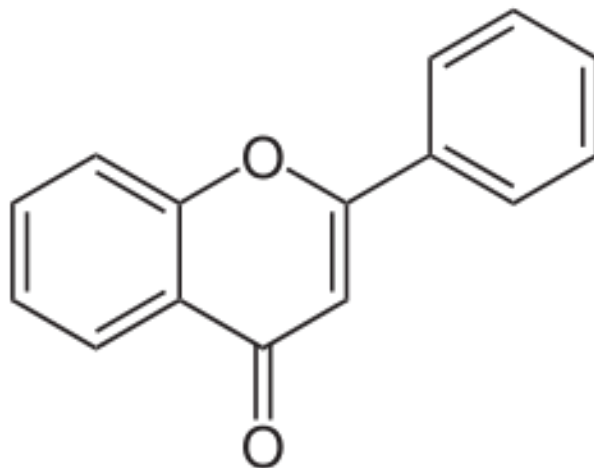
Najznačajnija magnetska svojstva magnetitnih nanočestica su njihova reakcija na vanjsko magnetsko polje i njihova magnetizacija, koja se obično dobiva iz mjerenih petlji histereze (M-H) i krivulje uzoraka hlađenih bez polja i uz polje (ZFC / FC, M-T). Magnetizacija zasićenja ( $M_s$ ), može se odrediti iz petlje histereze. U slučaju kada su magnetitne nanočestice superparamagnetične M-H krivulja ne pokazuje histerezu, a krivulje magnetizacije se preklapaju<sup>[9]</sup>.

Vanjsko magnetsko polje uzrokuje preusmjeravanje magnetskih momenata pojedine čestice duž primijenjenog polja pri niskim temperaturama. Primjenom vanjskog oscilirajućeg magnetskog polja tako se pojavljuje reorijentacija nanočestica i time povećava precesija nanočestica koje na taj način uzrokuju povećanje otpuštanja lijeka iz nanočestica<sup>[10]</sup>.

## 2.2. Flavonoidi

Flavonoidi ili bioflavonoidi su aromatski sekundarni metaboliti biljaka. Široko su rasprostranjeni u biljkama gdje ispunjavaju mnoge funkcije. Najvažniji su pigmenti biljaka za boju cvijeća, stvaraju žute, plave ili crvene pigmente u laticama radi privlačenja kukaca koji skupljaju pelud. Kod složenijih biljaka flavonoidi sudjeluju u UV filtraciji, simbioznoj fiksaciji dušika i u pigmentaciji<sup>[11]</sup>. Interes za flavonoide je vezan uz njihovu raznolikost, biološki značaj kao sekundarnih metabolita biljaka, ekološku ulogu, utjecaj na kvalitetu voća, fiziološke efekte, antioksidativnu aktivnost te industrijsku primjenu<sup>[12]</sup>.

Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil) propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavanom od kojeg proizlaze osnovne strukture flavonoida. Mogu se smatrati derivatima benzo- $\gamma$ -pirona ili benzo- $\gamma$ -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<sup>[13]</sup>.

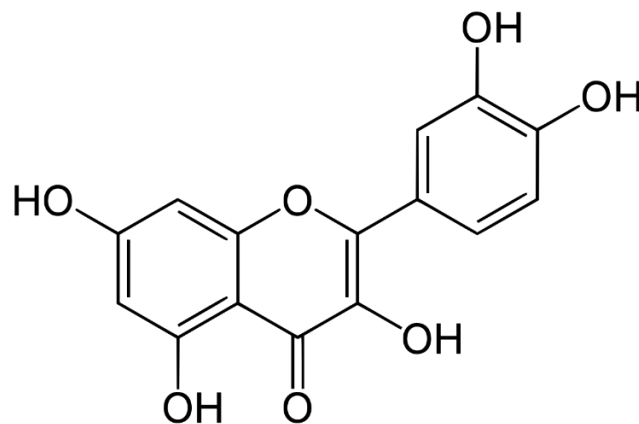


Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonoida<sup>[14]</sup>

Flavonoidi su velika obitelj od preko 5000 hidroksilnih polifenolnih spojeva i klasificirani su u 12 podvrsta na temelju svoje kemijske strukture, od čega 6 podvrsta unosimo prehranom, a to su: anticijanidi, flavan-3-oli, flavonoli, flavoni, flavanoni i izoflavoni. Prehrambeni proizvodi koji sadrže flavonoide su voće, povrće, čokolada te pića poput vina i čaja. Flavonoidi pokazuju antiupalna svojstva, štite stanice neurona, pomažu u borbi protiv tromboze, dijabetesa i raka kroz različite mehanizme koji su dokazani *in vitro* te pomoću životinjskih modela<sup>[15]</sup>.

### 2.2.1. Kvercetin

Kvercetin je flavonol koji često možemo naći u crnom grožđu, citrusnom voću, rajčici, brokuli i ostalom zelenom povrću te u bobastom voću poput maline i brusnice<sup>[16]</sup>. Naziv prema IUPAC nomenklaturi je 3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavanon, što nam govori da posjeduje OH skupine na pozicijama 3, 5, 7, 3', i 4'.



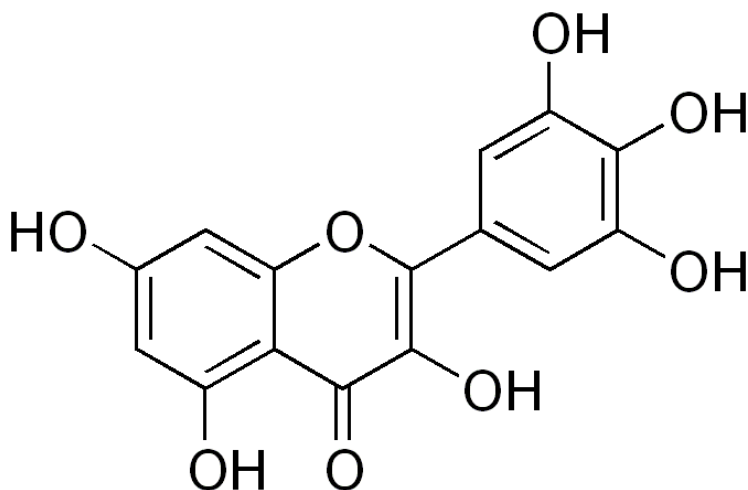
Slika 3. Prikaz kemijske strukture kvercetina<sup>[17]</sup>

Izgledom je briljantni žuti igličasti kristal i potpuno je netopljiv u vodi, slabo topljiv u vrućoj vodi, ali dobro topljiv u alkoholu i lipidima. Kvercetin glikozid se formira dodavanjem glikozilne skupine (šećer poput glukoze, ramnoze ili rutinoze) kao zamjene za jednu od OH skupina, često na poziciji 3. Priložena glikozilna skupina može promijeniti topljivost, apsorpciju i *in vivo* učinke. Generalno se smatra da prisutnost glikozilne skupine rezultira povećanom topljivošću u vodi u usporedbi s kvercetin aglikonom (kvercetinom koji ne posjeduje šećernu skupinu)<sup>[18]</sup>.

Kvercetin posjeduje dugotrajno protuupalno djelovanje<sup>[19]</sup>. Protuupalni potencijal se uočava na različitim tipovima stanica, kako u životinjskim tako i ljudskim modelima. Poznato je da posjeduju i stabilizaciju mastocita i gastrointestinalnu citoprotektivnu aktivnost<sup>[20]</sup>. Također može igrati modulacijsku, dvofaznu i regulatornu akciju na upalu i imunitet<sup>[21]</sup>. Osim toga, kvercetin ima imunosupresivni učinak na funkciju dendritskih stanica<sup>[22]</sup>.

## 2.2.2. Miricetin

Miricetin je također flavanol te se prema IUPAC nomenklaturi naziva 3,3',4',5,5',7-heksahidroksiflavon što znači da posjeduje OH skupine na pozicijama 3, 5, 7, 3', 4' i 5'. Strukturno je povezan s nekoliko vrlo poznatih fenolnih spojeva poput kvercetina, morina, kaemferola i fisetina, a ponekad se i upotrebljava naziv hidroksikvercetin zbog velike strukturne sličnosti među njima.

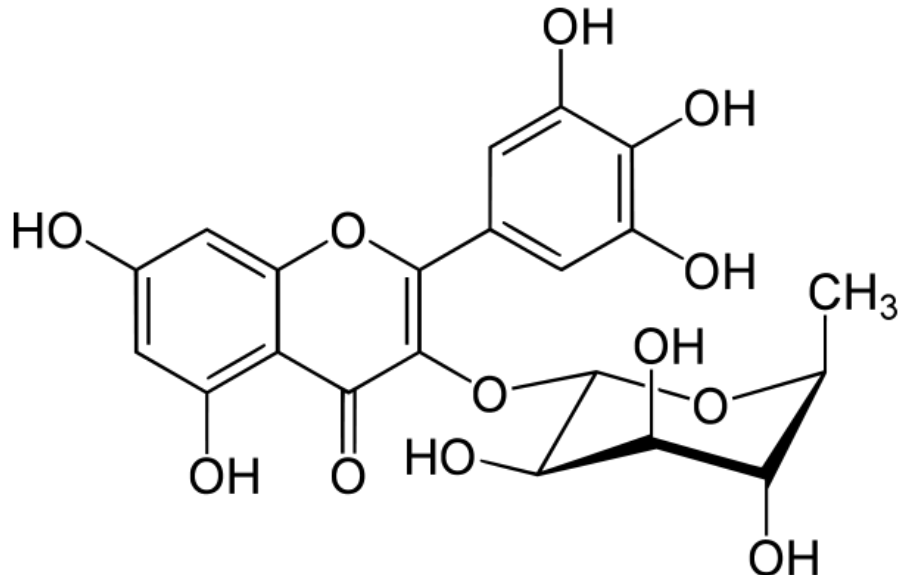


Slika 4. Kemijska struktura miricetina<sup>[23]</sup>

Slabo je topljiv u vodi ( $16,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ali se brzo otapa kad se deprotonira u bazičnim vodenim medijima i u nekim organskim otapalima kao što su dimetilformamid, dimetilacetamid, tetrahidrofuran i aceton<sup>[24]</sup>. Štoviše, iako je najstabilniji pri bazičnim uvjetima ( $\text{pH} = 12$ ), degradacija ovog spoja je  $\text{pH}$  i temperaturno ovisna. Miricetin je jedan od ključnih sastojaka mnogih prehrambenih namirnica i pića uključujući povrće, čajeve i voće, a prepoznatljiv je po svojim željezo-kelatnim, antikancerogenim, antidijabetičkim, antioksidativnim i protuupalnim svojstvima. Prikazuje nekoliko aktivnosti koje se odnose na središnji živčani sustav i brojne su studije pokazale da spoj može biti od koristi za zaštitu od bolesti poput Parkinsonove bolesti i Alzheimerove bolesti. Upotreba miricetina kao sredstva za konzerviranje produljenja roka trajanja hrane koja sadrži ulja i masti pripisuje se sposobnosti spoja da zaštiti lipide od oksidacije<sup>[25]</sup>. Smatra se je da njegov snažan inhibicijski efekt na rast i proliferaciju određenih malignih stanica *in vitro* zbog inhibicije fosfatidilinozitol kinaze, enzima koji igra glavnu ulogu u prijenosu signala i transformaciji stanica<sup>[26]</sup>.

### 2.2.3. Miricitrin

Miricitrin je 3-O- $\alpha$ -L-ramnofiranozid miricetina. 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 5. Kemijska struktura miricitrina<sup>[27]</sup>

Miricetin je prirodni flavonoid koji se nalazi u mnogim grožđicama, bobicama, voću, povrću, kao i drugim biljkama kao npr. orasima koji su bogat izvor miricitrina. Dokazano je da ima antioksidacijska svojstva<sup>[28]</sup>. Miricitrin je inhibitor dušikovog oksida (NO) i proteina kinaze C (PKC) koji ima aktivnost središnjeg živčanog sustava, uključujući anksiolitičko djelovanje, što upućuje na učinak sličan antipsihotiku<sup>[29]</sup>. Zbog svoje inhibicije dušikovog oksida posjeduje i protuupalna svojstva, značajno smanjuje infiltraciju upalnih stanica u plućnim tkivima<sup>[30]</sup>.

### 2.3. Oksidacijski stres i slobodni radikali

Oksidacijski stres je stanje u kojem oksidacijski procesi prevladaju antioksidativne sposobnosti stanica tkiva ili organizama. Oštećenje stanice izazvano je slobodnim radikalima koji se stvaraju tijekom aerobne respiracije stanice u oksidacijskom stresu. U ravnotežnim uvjetima, slobodni radikali razgrađeni su staničnim antioksidansima, uz pomoć enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaze i glutation peroksidaze ili neenzimatski uz pomoć glutaciona. Do pomaka ravnoteže može doći ukoliko je smanjena antioksidativna sposobnost organizma ili ako je povećano stvaranje radikala. Ovakav poremećaj ravnoteže prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa definira se kao „oksidacijski stres“<sup>[31]</sup>. Slobodni radikali karakteristični su po svojoj visokoj aktivnosti jer imaju jedan ili više nesparenih valentnih elektrona. Radikal svojom slobodnom valencijom napada neku drugu molekulu, dolazi do pregrupacije elektrona i time se stvara lančana reakcija čiji se ciklus mnogo puta ponavlja što rezultira stvaranjem sve većeg broja slobodnih radikala koji oštećuju stanice organizma. Slobodni radikali nastaju pod utjecajem različitih faktora, kao što su: pušenje, izloženost ionizirajućem zračenju, UV zrakama, zagađenom zraku, kao posljedica metaboličkih procesa te upala. Da bismo se obranili od slobodnih radikala, potrebno je u organizam unositi antioksidanse. Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale donirajući im svoj elektron te na taj način prekidaju lančanu reakciju. Donirajući im svoj elektron, antioksidansi ne postaju nestabilni. Najvažniji su antioksidansi vitamini C i E. Flavonoidima su također potvrđena antioksidativna svojstva zbog svoje mogućnosti inaktiviranja slobodnih radikala, a također imaju široki spektar primjene zbog protuupalnog i antikancerogenog djelovanja. Također štite stanice neurona, pomažu u borbi protiv tromboze, dijabetesa i mnogih drugih bolesti.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali i kemikalije**

Kemikalije korištene tokom rada bile su: metanol (Kemika, Zagreb), 96%-tni etanol (TTT d.o.o., Sveta Nedjelja), fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS, Lach-ner, Češka), kalijev bromid (Sigma-Aldrich), amonijev acetat (Sigma-Aldrich), polietilen glikol (PEG, Sigma-Aldrich), željezov triklorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , Alfa Easar, Njemačka), kloroform (Lach-ner, Češka), etilen glikol (Lach-ner, Češka), flavonoid kvercetin (Lach-ner, Češka), flavonoidi miricetin (TCI, Kasei Tokio), miricitrin (TCI, Kasei Tokio), silikonsko ulje (Acros Organics, Francuska).

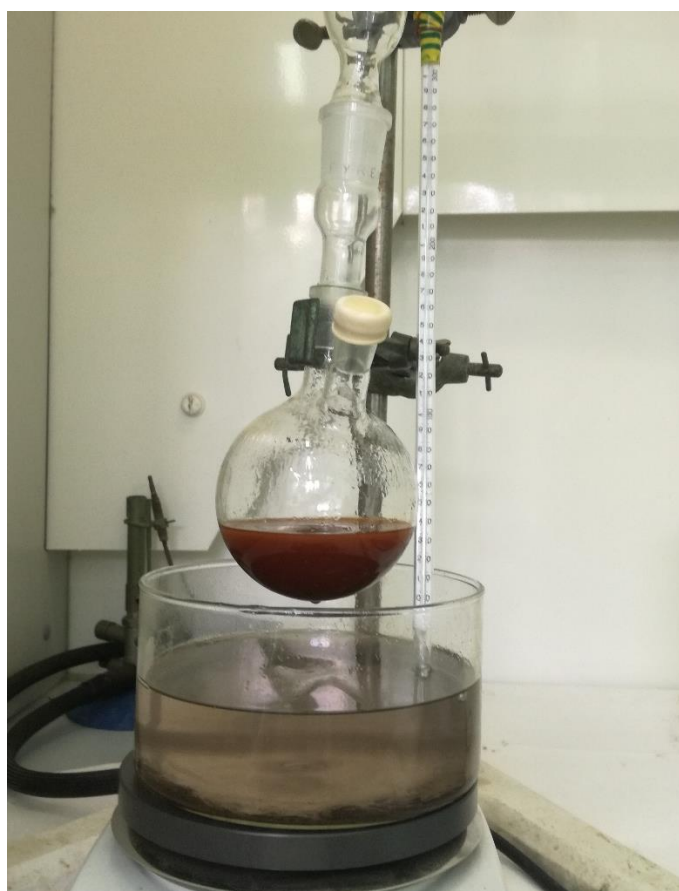
Korištene su membrane za dijalizu (Spectrum Laboratories Inc., Nizozemska) duljine 12,3 cm, širine 20 mm i veličine pora 7,5 nm.

#### **3.2. Preparacija nanočestica**

3,85 g amonijevog acetata, 1,35 g željezovog triklorid heksahidrata i 0,50 g polietilen glikola (PEG) su otopljeni u 70 mL etilen glikola. Otopina je miješana grijačem miješalicom Heidolph MR Hei-Standard 1 h pri 160°C u silikonskom ulju u inertnoj atmosferi ( $\text{N}_2$ , Messer, Njemačka). Nakon grijanja i miješanja dobivena otopina tamne boje je prenesena u autoklav BLH 800 Berghof uz koji je priključen termostat BTR-2000A u kojem se zagrijavala 16,5 h pri 200 °C. Nakon zagrijavanja u autoklavu nanočestice su se ohladile na sobnu temperaturu. Sintetizirane nanočestice su ispirane etanolom 3 puta pomoću centrifuge Universal 320 Hettich i zatim su sušene u eksikatoru s modrom galicom.



*Slika 6. Aparatura za sintezu magnetitnih nanočestica: električno grijalo i miješalo, posuda s uljem, tikvica s okruglim dnom, Liebigovo hladilo na koje je spojen balon napunjen dušikom, autoklav i termostat*



*Slika 7. Otopina nakon zagrijavanja i miješanja u struji dušika 1 h pri 160°*

### **3.3. Karakterizacija nanočestica**

#### **3.3.1. Rendgenska difrakcija praha (XRPD)**

Rendgenska difrakcija polikristalita koristi se za određivanje veličine kristalita, kristala i amorfni materijala te radi otkrivanja strukture kristalita. U difrakcijskoj strukturnoj analizi koristi se monokromatsko rendgensko zračenje malih valnih duljina u rasponu od 0,05 do 0,25 nm. Budući da valna duljina aproksimira veličinu atoma, zračenje je pogodno za određivanje strukturnog uređenja atoma i molekula različitih materijala. XRPD analiza sintetiziranih nanočestica se provodila pri sobnoj temperaturi korištenjem Philips MPD 1880 difraktometra s monokromatskim CuK $\alpha$  pri zračenju valne duljine od 0,1541 nm. Svi uzorci su snimani pod kutom 2-15 u razmaku 10-70 ° pri koracima od 0.02 ° s fiksnim vremenom od 10 s pri svakom koraku.

#### **3.3.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)**

Svrha pretražne elektronske mikroskopije je određivanje veličine i distribucije veličina čestica, njihove morfologije, homogenost materijala, mehaničkih oštećenja i strukturnih defekata. SEM analiza provedena je na Jeol JSM-7000F pretražnom elektronskom mikroskopu koji je priključen na Oxford Instruments EDS/INCA 350 analizator dispergirane energije rendgenskih zraka. U ovom slučaju određena je raspodjela veličine čestica korištenjem Image-J (Media Cybernetics, USA) programskog alata. Načinjen je histogram promjera nanočestica određivanjem promjera barem 500 nanočestica na temelju dobivenih SEM slika.

#### **3.3.3. Brunauer-Emmet-Teller analiza (BET)**

BET mjerenja adsorpcijom-desorpcijom dušika izvršena su ASAP2020 (Micromeritics, SAD) akceleriranim analizatorom površine pri 77 K. Prethodno su uklonjeni svi plinovi iz uzorka u vakuumu pri 120 °C tijekom 6 h. Svrha BET analize je određivanje specifične površine, promjera i volumena pora magnetitnih nanočestica.

### **3.3.4. Magnetska mjerenja**

Magnetska mjerenja izvršena su u svrhu potvrđivanja superparamagnetičnih svojstva sintetiziranih magnetitnih nanočestica. Magnetizacija praškastih uzoraka nanočestica mjerena je s MPMS-5 komercijalnim magnetometrom opremljenim sa supravodljivim kvantnim interferometrom (SQUID). Mjerenja uzoraka su korigirana s obzirom na ampulu i uvjete koji su temperaturno ovisni. Ovisnost polja o magnetizaciji i petlja magnetske histereze mjereni su pri temperaturi 290 K u polju veličine do 10 kOe.

### **3.3.5. Infracrvena spektroskopija Fourierovom transformacijom (FTIR)**

Uzorci su pretraženi FTIR spektroskopijom (infracrvena spektroskopija Fourierovom transformacijom) na ABB Bomem MB102 spektrometrom koji je opremljen CsI optikom i DTGS detektorom. Prilikom pripreme tablete prah kalijeva bromida i uzorka nanočestica je dobro promiješan 2 min, zatim u preši komprimiran u ampulu koja je umetnuta u FTIR uređaj. Pozicija vrpca je određena 4  $\text{cm}^{-1}$  rezolucijom i s 32 scana iz 5 baseline korigiranih apsorpcijskih točaka pri 25 °C. Maksimum je procijenjen pomoću polinoma drugog reda. Svrha FTIR mjerenja je potvrda ugradnje flavonoida u nanočestice.

### **3.3.6. Mjerenje zeta potencijala ( $\xi$ )**

Zeta potencijal ( $\xi$ ) magnetitnih nanočestica izmjeren je elektroforetskim raspršenjem svjetlosti M3-PALS tehnikom pomoću uređaja Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) opremljenim zelenim laserom (532 nm). Sva mjerenja su provedena pri 25 °C. Za obradu eksperimentalnih rezultata se koristio Zetasizer software 6.32 (Malvern instruments). Rezultati su izneseni kao aritmetička sredina od 3 neovisna mjerenja. Elektrokinetički ili zeta-potencijal važan je parametar dvojnog električnog sloja i predstavlja jednoznačnu karakteristiku električnih svojstava na kontaktu faza čvrsto-tekuće i tekuće-plinovito. Pokazao se izuzetno relevantnim za praktičnu studiju i kontrolu koloidne stabilnosti i flokulacijskih procesa. Mjerenje zeta potencijala koristilo se za dokazivanje ugradnje flavonoida u nanočestice.

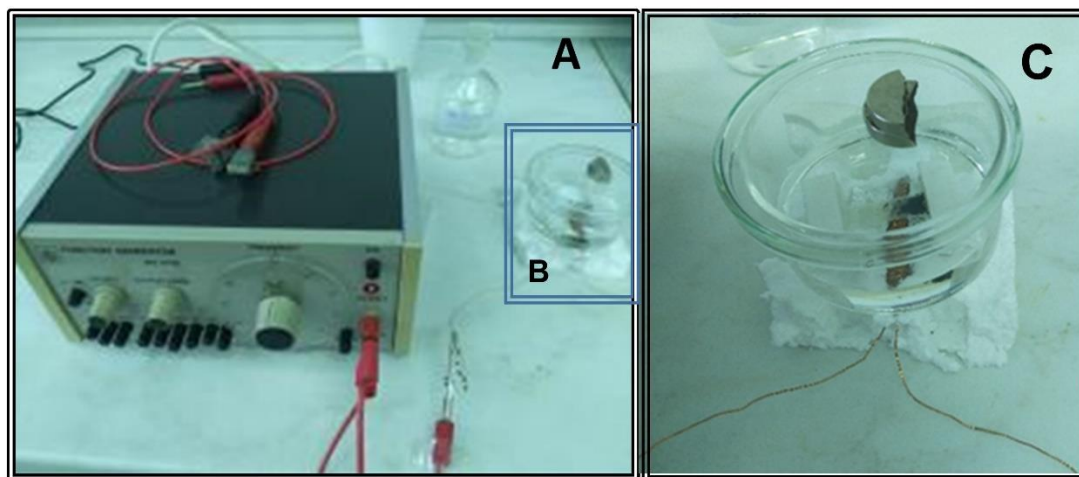
### 3.4. Ugradnja flavonoida u nanočestice

Pripremljene su zasićene otopina flavonoida. Zasićene otopine flavonoida pripremljene se iz topljivosti iz literaturnih podataka. Topljivost kvercetina 634 mg u 100 mL etanola<sup>[36]</sup>, topljivost miricetina 5,05 g na 100 mL etanola<sup>[37]</sup>, topljivost miricitrina 12 mg u 100 mL vode<sup>[38]</sup>. Za potpomognuto otapanje korištena je ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex. Pomiješano je 60 mg nanočestica u 31,5 mL zasićene otopine kvercetina (maseni omjeri nanočestica prema kvercetin u iznosio je 6:19), 200 mg nanočestica u 30 mL zasićene otopine miricetina (maseni omjeri nanočestica prema miricetinu iznosio je 20:24), te 90 mg nanočestica u 50 mL zasićene otopine miricitrina (maseni omjeri nanočestica prema miricitrinu iznosio je 15:1). Suspenzija se tresla 24 h pri 30 °C u tresilici Barnstead Lab-Lie 4450 e-class. Nakon ugradnje napunjene nanočestice su ispirane 3 puta u etanolu kako bi se uklonili svi neadsorbirani flavonoidi. Prilikom ispiranja korištene su male tresilice bioSan Vortex v-1 plus i IKA Vortex 1 te centrifuga Universal 320 Hettich. Nakon ispiranja napunjene nanočestice su prenesene na sušenje u eksikator s modrom galicom. Koncentracija zasićenih otopina flavonoida i supernatanta nakon ugradnje određene su UV-VIS spektrofotometrom Cary 50, Agilent Technologies. Prethodno su određene kalibracijske krivulje u koncentracijskom području od  $1 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Maksimumi absorbancije određeni su: pri 382,72 nm za otopljeni kvercetin u etanolu i PBS-u (1:1) i pri 374,19 nm u etanolu; pri 340,06 nm za otopljeni miricetin u etanolu i PBS-u (1:1) i pri 382,72 nm u etanolu; pri 351,46 nm za otopljeni miricitrin u etanolu i PBS-u (1:1) i pri 346,62 nm u vodi. Razlika koncentracija otopina flavonoida prije i nakon ugradnje izračunala se efikasnost ugradnje flavonoida u magnetitne nanočestice uzimajući u obzir masu ugrađenih nanočestica koja su bile u otopinama. Efikasnost ugradnje flavonoida u nanočestice izračunala se prema izrazu:

$$LE (\text{efikasnost ugradnje}) = m (\text{ugrađenih flavonoida}) / m (\text{nanočestica}) \quad (1)$$

### 3.5. Određivanje kinetike otpuštanja flavonoida

Mjerenja su provedena bez utjecaja magnetskog polja i uz kombinaciju permanentnog (0,19 T) i oscilirajućeg magnetskog polja frekvencija 10 Hz, 1,0 Hz i 0,1 Hz. Vanjsko oscilirajuće magnetsko polje je realizirano pomoću generatora MA 3730 jačine struje od 100 mA koji je spojen na zavojnicu od 270 navoja duljine 4 cm. Izvor permanentnog magnetskog polja je magnet. Između 2 magnetska polja postavljena je poklopljena staklena posuda. Unutar posude je 30 mL otopine etanola i PBS-a (50:50 vol. %) u koju je uronjena membrana koja sadrži 60 mg magnetitnih nanočestica napunjenih flavonoidima. Alikvoti volumena 1,5 mL su uzimani 11 puta tokom 4 h. Apsorbancije uzoraka su snimane UV-VIS spektrofotometrom Cary 50, Agilent Technologies, a koncentracije flavonoida su određene na temelju kalibracijskih krivulja.

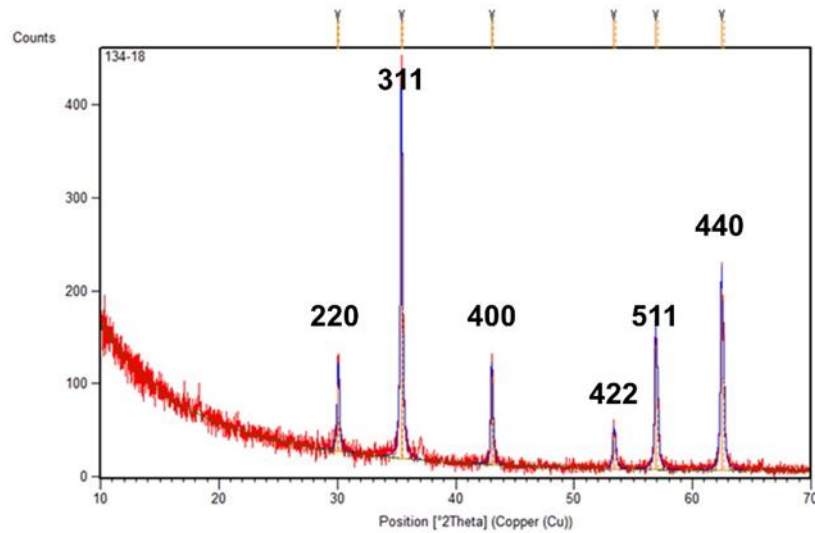


*Slika 8.8 Aparatura za određivanje kinetike otpuštanja flavonoida iz napunjenih magnetitnih nanočestica*

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. XRPD rezultati za magnetitne nanočestice

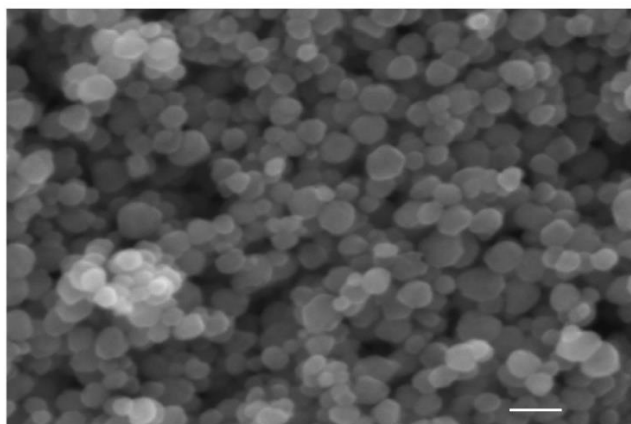
Rendgenska difrakcija praha pokazala je da difrakcijski maksimumi sintetiziranih nanočestica podvrgnutih analizi odgovaraju magnetitnoj kubičnoj strukturi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Ustanovljeno je da je veličina kristalita oko 35 nm.



Slika 9. XRPD rezultat uzorkovanih magnetitnih nanočestica sintetiziranih PEG-om 4000

### 4.2. Rezultati SEM analize za magnetitne nanočestice

Rezultati pretražne elektronske mikroskopije pokazuju da su sintetizirane nanočestice koje se primarno sastoje od  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  uglavnom jednolične po veličini i obliku. Raspodjela veličina čestica pokazuje da je njihova srednja veličina oko 58 nm uz standardnu devijaciju od 18 nm. Histogram načinjen na temelju SEM snimke pokazuje da je raspodjela veličina čestica monomodalna. Najveći broj čestica nalazi u rasponu od 36,8 nm do 63,8 nm (njih 300 od 500 odnosno 60%) što potvrđuje usku raspodjelu veličina.

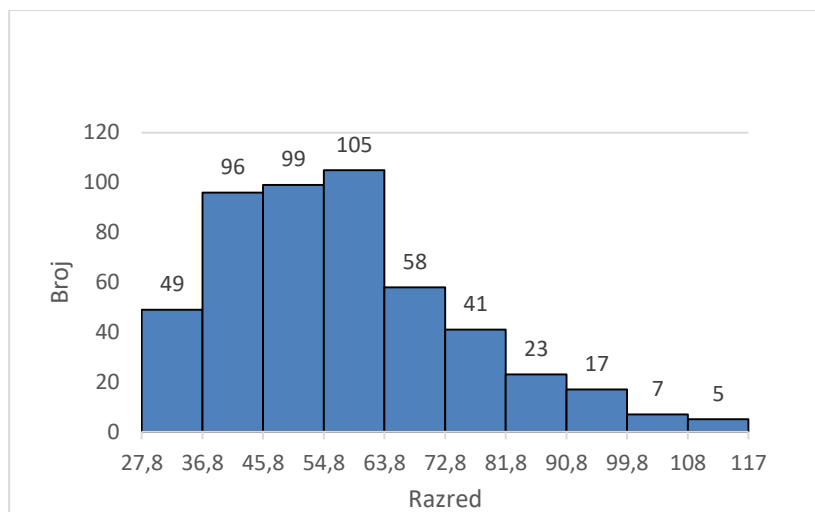


Slika 10. Prikaz sintetiziranih magnetitnih nanočestica pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (bar =100 nm)

Tablica 1. Određen promjer magnetitnih nanočestica korištenjem Image-J (Media Cybernetics, SAD)

| <b>Tablica frekvencije</b> |             | <b>Histogram</b>                  |         |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|---------|
| <i>Razred</i>              | <i>Broj</i> | <i>Srednja vrijednost</i>         | 57,619  |
| 27,800 - 36,799            | 49          | <i>Standardna devijacija (s)</i>  | 17,546  |
| 36,800 - 45,799            | 96          | <i>Najmanja vrijednost</i>        | 27,873  |
| 45,800 - 54,799            | 99          | <i>Najveća vrijednost</i>         | 117,174 |
| 54,800 - 63,799            | 105         | <i>Raspon podjele</i>             | 89,301  |
| 63,800 - 72,799            | 58          | <i>Ukupni broj uzoraka</i>        | 500     |
| 72,800 – 81,799            | 41          | <i>Broj vidljivih uzoraka</i>     | 459     |
| 81,800 – 90,799            | 23          | <i>Najniža vrijednost razreda</i> | 27,800  |
| 90,800 – 99,799            | 17          | <i>Najviša vrijednost razreda</i> | 117,799 |
| 99,800 – 108,799           | 7           | <i>Broj razreda</i>               | 10      |
| 108,800 – 117,799          | 5           | <i>Raspon razreda</i>             | 9       |





Slika 9. Histogram veličine magnetitnih nanočestica

### 4.3. Rezultati BET analize magnetitnih nanočestica

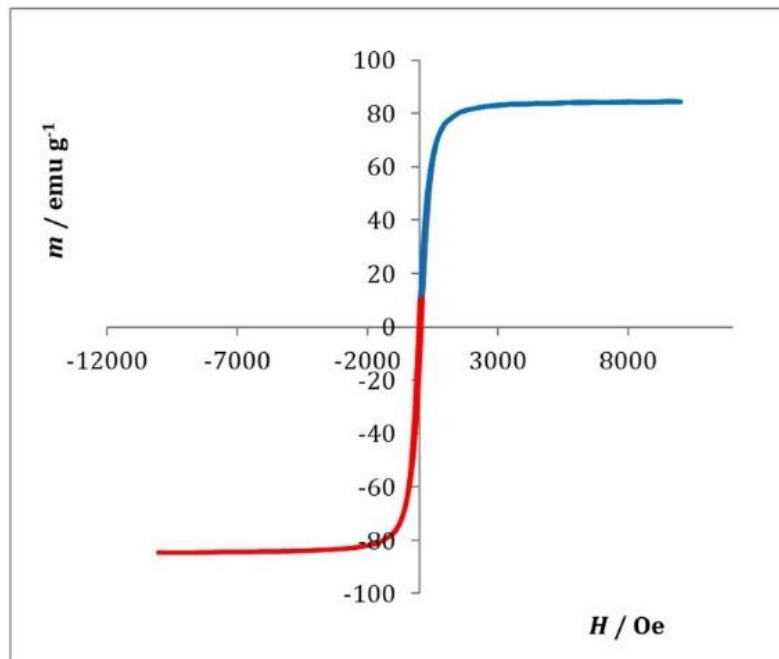
BET izoterme mjerenja magnetitnih nanočestica adsorpcijom-desorpcijom dušika su pokazale da je specifična površina čestica  $16,69 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , promjer pora  $25,93 \text{ nm}$  i volumen pora  $0,106 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Određena specifična površina i volumen pora BET analizom potvrđuju pretpostavku da magnetitne nanočestice imaju mesoporoznu strukturu.

Tablica 2. Eksperimentalni uvjeti pri kojima je provedena BET analiza

| Faza evakuacije     |  | Faza zagrijavanja |  |
|---------------------|--|-------------------|--|
| Brzina zagrijavanja | $10,0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ | Brzina            | $10,0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ |
| Temperatura         | $100 \text{ }^\circ\text{C}$           | Temperatura       | $110 \text{ }^\circ\text{C}$           |
| Brzina              | $1333,22 \text{ Pa s}^{-1}$            | Vrijeme           | 720 min                                |
| Tlak                | $0,0026664473 \text{ Pa}$              |                   |  |
| Vrijeme             | 60 min                                 |                   |  |

#### 4.4. Rezultati magnetskih mjerenja

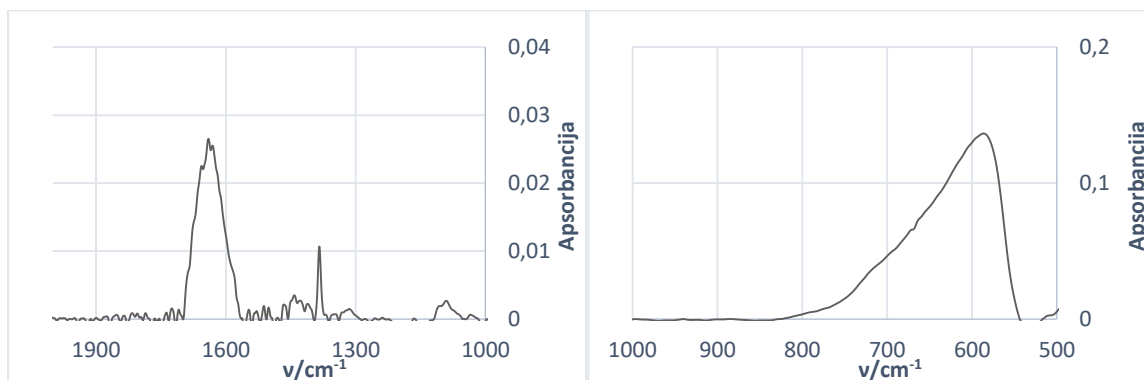
Magnetska karakterizacija korištenjem magnetometra pri 290 K pokazala je da magnetitne nanočestice sintetizirane s 500 mg PEG-a imaju magnetsko zasićenje od 84,5 emu g<sup>-1</sup>. Rezultati su također potvrdili superparamagnetična svojstva čestica što ih čini pogodnima za primjenu unutar magnetskog polja.



Slika 12. Krivulja magnetske histereze magnetitnih nanočestica

#### 4.5. Rezultati FTIR analize magnetitnih nanočestica

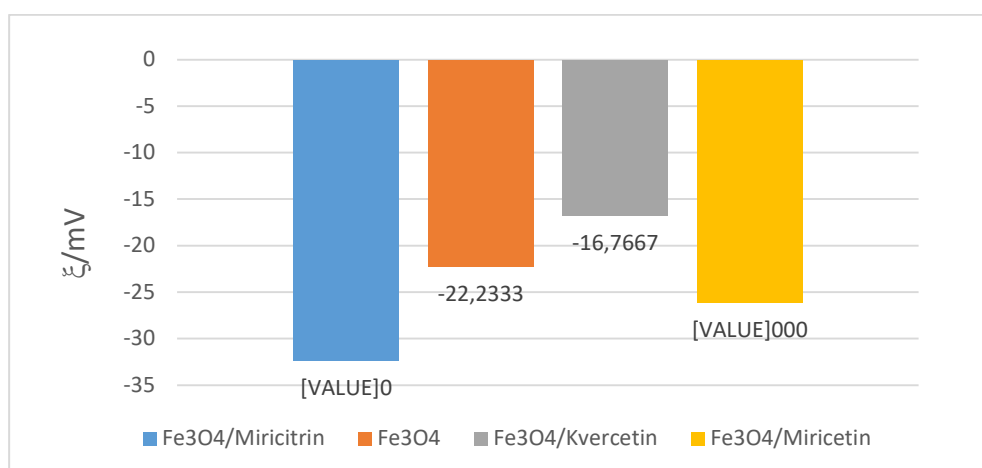
IR spektar magnetitnih nanočestica koje su sintetizirane s PEG-om pokazuju tri značajne vrpce. Prva vrpca pri valnom broju od  $1630\text{ cm}^{-1}$  predstavlja izvijanje Fe-O veze. PEG prikazuje vrpca na  $1100\text{ cm}^{-1}$ <sup>[32]</sup>. Karakteristična vrpca magnetita vidi se pri  $580\text{ cm}^{-1}$ <sup>[33]</sup>.



Slika 13. Rezultati infracrvenog spektra uzorka magnetitnih nanočestica u području od  $1900$  do  $500\text{ cm}^{-1}$

#### 4.6. Rezultati mjerenja zeta potencijala ( $\xi$ )

Rezultati mjerenja zeta potencijala ( $\xi$ ) pri  $25^\circ\text{C}$  u mili-Q vodi za magnetitne nanočestice i magnetitne nanočestice s ugrađenim flavonoidima su prikazani grafički.



Slika 14. Prikaz rezultata mjerenja zeta potencijala ( $\xi$ ) u mV

Zeta potencijal magnetitnih nanočestica iznosi -22,2333 mV. Nakon ugradnje miricitrina i miricetina zeta potencijal postaje negativniji: -32,3330 mV za miricitrin i -26,1000 mV za miricetin. Nakon ugradnje kvercetina zeta potencijal postaje pozitivniji i iznosi -16,7667 mV. Promjena zeta potencijala nakon ugradnje flavonoida potvrđuje uspješnost ugradnje. Čestice s većom vrijednosti zeta potencijala (pozitivnog ili negativnog) su električki stabilnije dok čestice s niskim zeta potencijalom imaju tendenciju koaguliranja ili flokuliranja. Prema tablici zeta potencijala<sup>[34]</sup> nanočestice ugrađene miricitrinom pokazuju srednju stabilnost, dok ostale pokazuju početnu nestabilnost.

*Tablica 3. Interpretacija vrijednosti zeta potencijala*

| Zeta potencijal [mV]    | Stabilnost koloida               |
|-------------------------|----------------------------------|
| od 0 do $\pm 5$         | Brza koagulacija ili flokulacija |
| od $\pm 10$ do $\pm 30$ | Početna nestabilnost             |
| od $\pm 30$ do $\pm 40$ | Srednja stabilnost               |
| od $\pm 40$ do $\pm 60$ | Dobra stabilnost                 |
| više od $\pm 61$        | Odlična stabilnost               |

#### 4.7. Rezultati ugradnje magnetitnih nanočestica flavonoidima

Rezultati ugradnje magnetitnih nanočestica flavonoidima izračunati su na temelju baždarnih pravaca prikazanim na slikama 15 do 20, te pokazuju da je uspješnost ugradnje kod kvercetina bila u rasponu od 12,1% do čak 51,98%, miricetina 3,80% i 7,62%, a miricitrina od 2,70% do 3,60%. Kvercetin je flavonoid koji je najveći broj puta bio ugrađivan, pokazao je najbolji postotak ugradnje i dobru reproducibilnost ugradnje.

Tablica 4. Rezultati ugradnje magnetitnih nanočestica kvercetinom

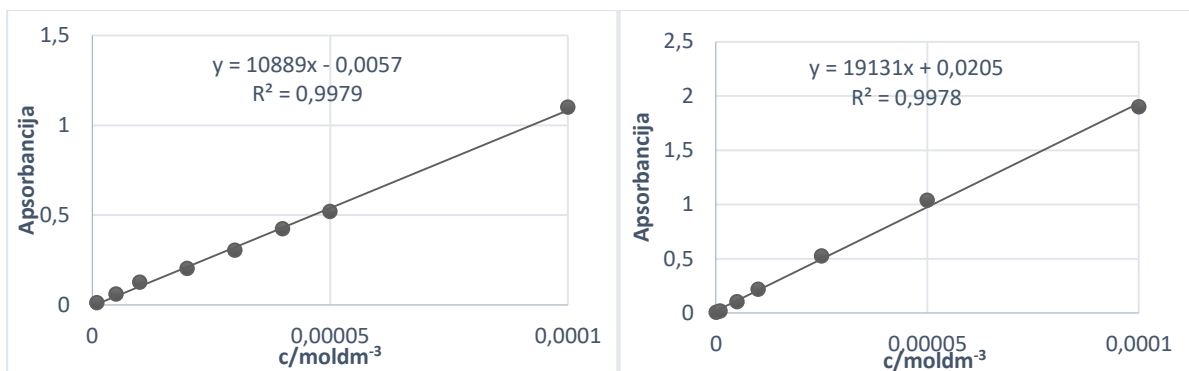
| OTOPINA                                    | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| $m (Fe_3O_4) / mg$                         | 60,78     | 60,57     | 60,24     | 60,52     | 60,46     | 60,44     |
| $c (kvercetin, zas.ot.) / mol dm^{-3}$     | 0,01973   | 0,01973   | 0,02080   | 0,02140   | 0,02407   | 0,02080   |
| $V (kvercetin, zas.ot.) / mL$              | 31,5      | 31,5      | 31,5      | 31,5      | 31,5      | 31,5      |
| $c (kvercetin, supernatant) / mol dm^{-3}$ | 0,01833   | 0,01896   | 0,01790   | 0,01980   | 0,02203   | 0,01750   |
| $c (kvercetin, ugrađeno) / mol dm^{-3}$    | 0,00140   | 0,00077   | 0,00290   | 0,00160   | 0,00204   | 0,00330   |
| $m (kvercetin, ugrađeno) / g$              | 0,0133290 | 0,0073307 | 0,0276090 | 0,0152327 | 0,0194220 | 0,0314170 |
| LE (učinkovitost ugradnje)                 | 0,2192930 | 0,1210291 | 0,4583210 | 0,2516969 | 0,3212320 | 0,5198120 |
|  | 21,90%    | 12,10%    | 45,80%    | 25,17%    | 32,10%    | 51,98%    |

Tablica 5. Rezultati ugradnje magnetitnih nanočestica miricetinom

| OTOPINA                                    | 1         | 2         |
|--|-----------|-----------|
| $m (Fe_3O_4) / mg$                         | 200,58    | 200,47    |
| $c (miricetin, zas.ot.) / mol dm^{-3}$     | 0,0246    | 0,0246    |
| $V (miricetin, zas.ot.) / mL$              | 30        | 30        |
| $c (miricetin, supernatant) / mol dm^{-3}$ | 0,0238    | 0,0230    |
| $c (miricetin, ugrađeno) / mol dm^{-3}$    | 0,0008    | 0,0016    |
| $m (miricetin, ugrađeno) / g$              | 0,0076380 | 0,0152755 |
| LE (učinkovitost ugradnje)                 | 0,0380780 | 0,0761985 |
|  | 3,80%     | 7,62%     |

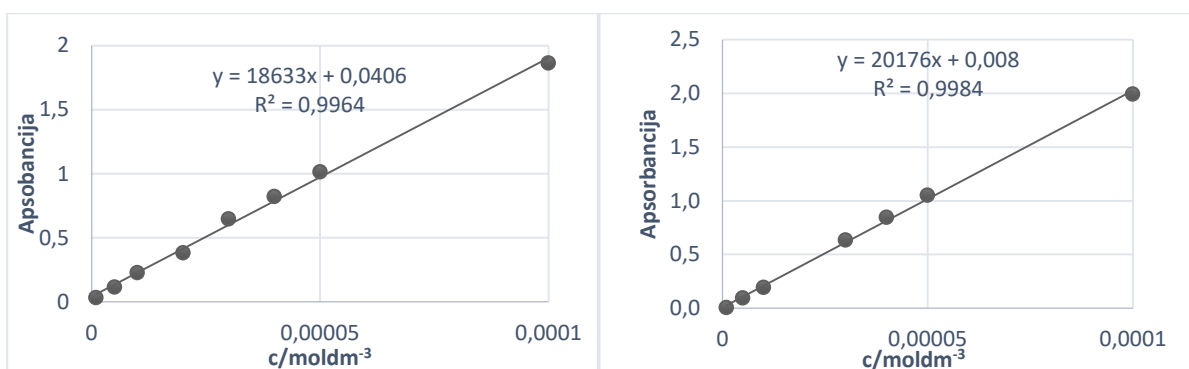
Tablica 6. Rezultati ugradnje magnetitnih čestica miricitrinom

| OTOPINA                                     | 1         | 2         | 3         | 4         |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| $m (Fe_3O_4) / mg$                          | 90,23     | 90,04     | 89,98     | 90,10     |
| $c (miricitrin, zas.ot.) / mol dm^{-3}$     | 0,0002770 | 0,0002768 | 0,0002770 | 0,0002768 |
| $V (miricitrin, zas.ot.) / mL$              | 50        | 50        | 50        | 50        |
| $c (miricitrin, supernatant) / mol dm^{-3}$ | 0,0001340 | 0,0001630 | 0,0001470 | 0,0001706 |
| $c (miricitrin, ugrađeno) / mol dm^{-3}$    | 0,0001430 | 0,0001138 | 0,0001300 | 0,000106  |
| $m (miricitrin, ugrađeno) / g$              | 0,0331570 | 0,0026423 | 0,0030140 | 0,0002466 |
| LE (učinkovitost ugradnje)                  | 0,0367470 | 0,0293461 | 0,0334940 | 0,0273680 |
|   | 3,60%     | 2,90%     | 3,30%     | 2,70%     |



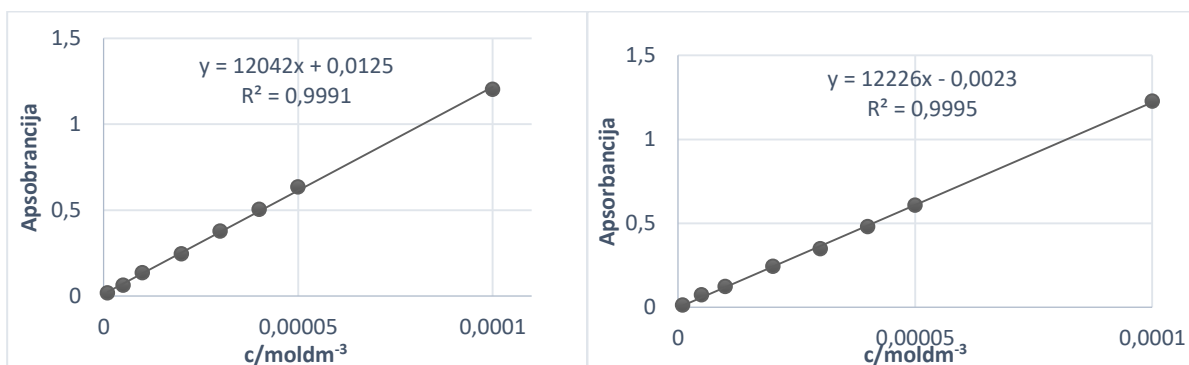
Slika 15. (lijevo) Kalibracijska krivulja kvercetina u otopini etanola i PBS-a pri maksimumu od 382,72 nm

Slika 16. (desno) Kalibracijska krivulja kvercetina u otopini etanola pri maksimumu od 374,19 nm



Slika 107. (lijevo) Kalibracijska krivulja miricetina u otopini etanola pri maksimumu apsorpcije od 377,89 nm

Slika 118. (desno) Kalibracijska krivulja miricetina u otopini etanola i PBS-a pri maksimumu apsorpcije od 340,06 nm

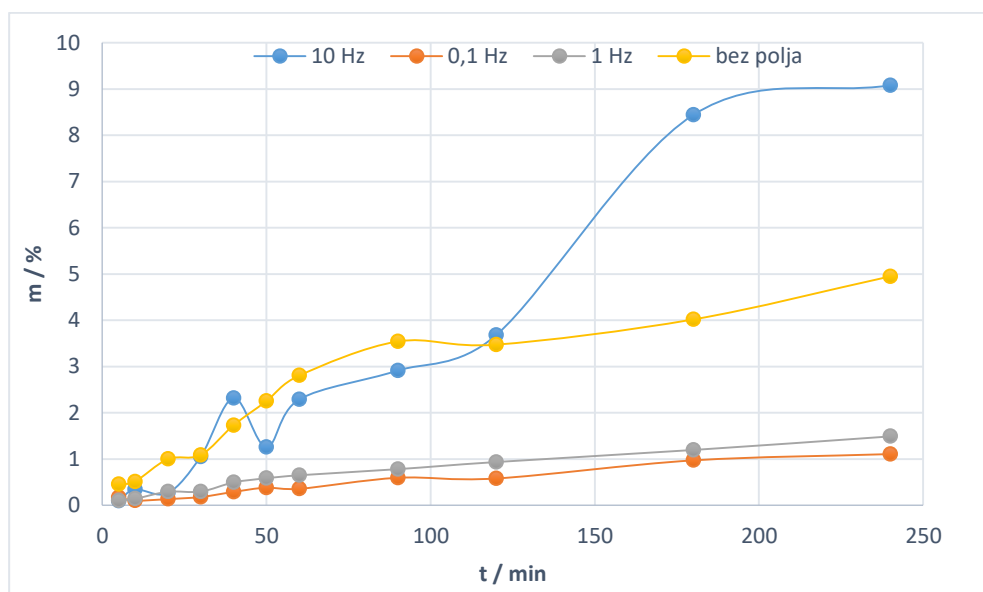


Slika 19. (lijevo) Kalibracijska krivulja miricitrina u vodenoj otopini pri maksimumu apsorpcije 346,62 nm

Slika 20. (desno) Kalibracijska krivulja miricitrina u otopini etanola i PBS-a pri maksimumu apsorpcije 351,46 nm

#### 4.8. Rezultati otpuštanja flavonoida iz magnetitnih nanočestica

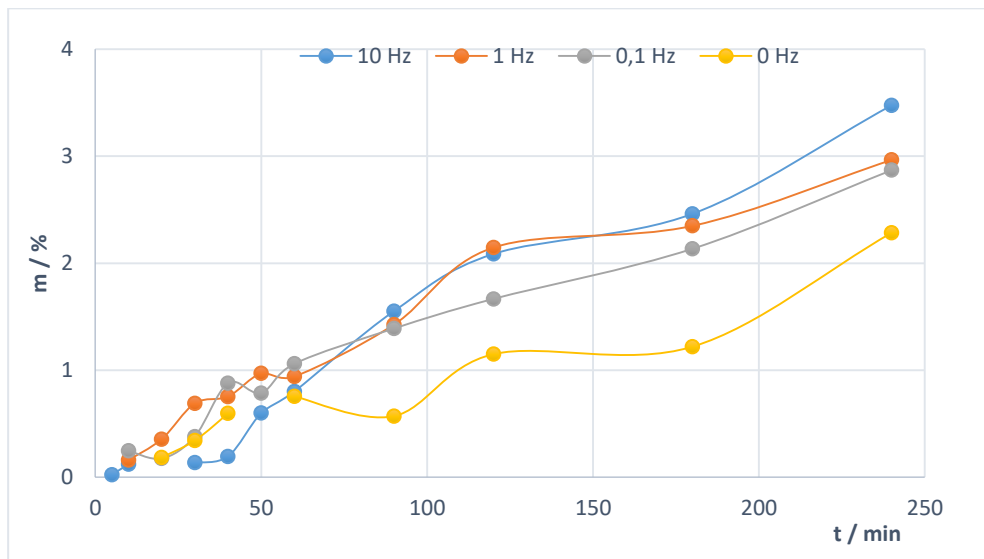
Otpuštanje flavonoida u otopinu etanola i PBS-a (50:50 vol.%) iz mesoporoznih magnetitnih nanočestica koje su bile postavljene u membrane određivano je UV/VIS spektrofotomerijom. Svako mjerenje je obavljeno unutar 240 min u jednakim vremenskim intervalima. Rezultati su prikazani kao promjena postotka mase ugrađenog flavonoida u vremenu, počevši s kvercetinom.



Slika 21. Prikaz otpuštanja kvercetina uz utjecaj magnetskog polja i bez

U ranoj fazi oslobađanja, nije primijećeno naglo otpuštanje primjenom oscilirajućeg magnetskog polja 0,1 Hz i 1,0 Hz. U tim slučajevima nije zabilježeno naglije povećanje, oslobađanje kvercetina je vrlo nisko i praktično isto (1% nakon 4 h). Bez utjecaja polja, u ranom stadiju oslobađanja, primijećen je nagli rast otpuštanja kvercetina. Nakon 120 min oslobađanje kvercetina doseglo je nešto više od 3% nakon čega slijedi stagnacija sve do 160-e min kada otpuštanje opet kreće rasti i na kraju doseže oko 4%. Pri otpuštanju primjenom oscilirajućeg magnetskog polja od 10 Hz prvi nagli rast je primijećen u 40-oj min kada prelazi 2%. Nakon pada oko 50-e minute slijedi rast otpuštanja od 3,7% nakon 2 h do konačnih 9%. Primjećujemo da je otpuštanje skoro dvostruko veće u usporedbi s oslobađanjem bez primijenjenih magnetskih polja (5%). Čak i vrlo niskofrekventna oscilirajuća polja u kombinaciji s permanentnim magnetskim poljem 0,19 T tako značajno utječu na otpuštanje profila.

Na slici 22. prikazan je rezultat otpuštanja miricetina pri jednakim uvjetima.

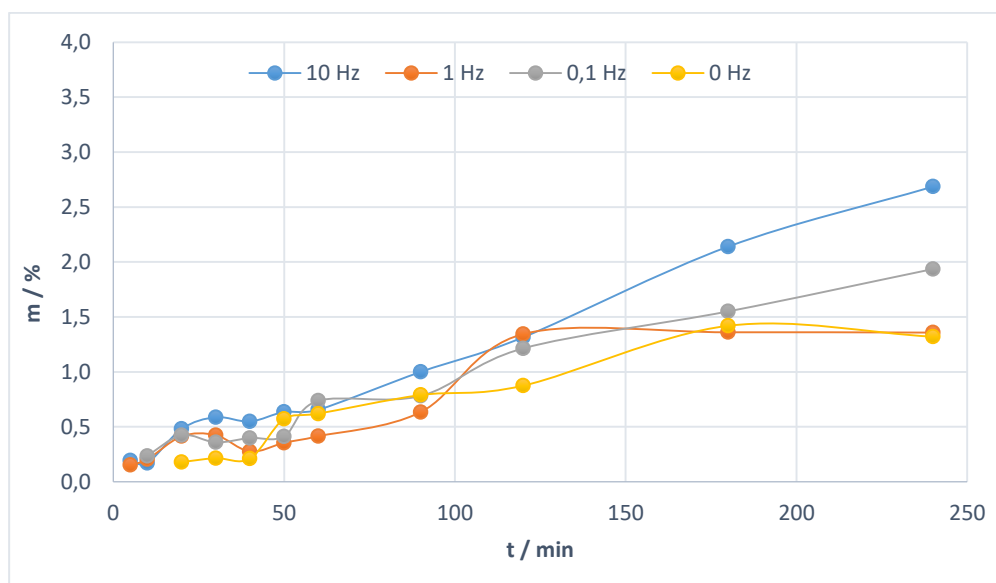


Slika 22. Prikaz otpuštanja miricetina uz utjecaj magnetskog polja i bez

U prvih sat vremena otpuštanja najveći porast otpuštanja primjećuje se primjenom oscilirajućeg magnetskog polja od 1,0 Hz. Otpuštanje nastavlja rasti i nakon 2 h doseže 2,15%. Slijedi stagnacija te nakon 4 h otpuštanje od 3%. Primjenom izmjeničnog magnetskog polja od 0,1 Hz primjećuje se konstantni rast otpuštanja od 60-e min te nakon 4 h doseže 2,90% . Bez utjecaja polja otpuštanje raste sve do 90-e min kada slijedi pad na 0,6 %, a nakon toga rast do 2,3 % nakon 4 h. Primjenom izmjeničnog magnetskog polja od 10 Hz u prvih 60 min primjećuje se slabo otpuštanje ispod 1%, a zatim slijedi konstantan rast sve do 3,5% nakon 4 h.



Na slici 23. prikazani su rezultati otpuštanja miricitrina.



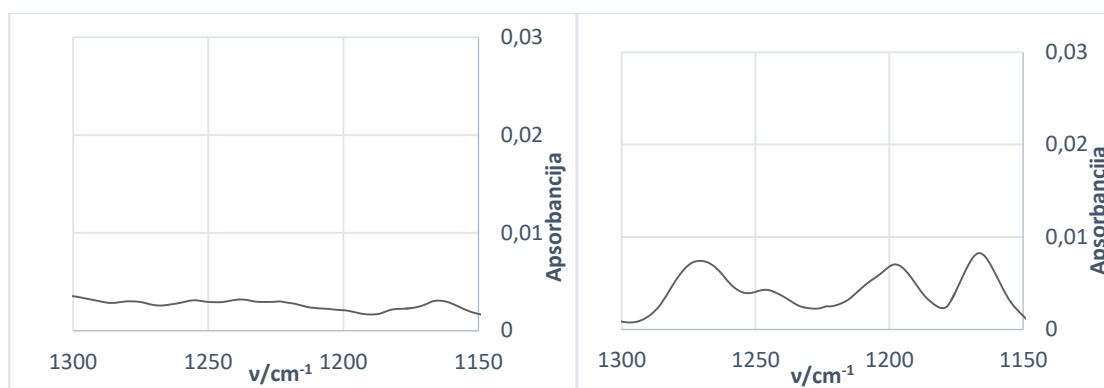
Slika 23. Prikaz otpuštanja miricitrina uz utjecaj magnetskog polja i bez

U prvih sat vremena najveće otpuštanje se primjećuje primjenom oscilirajućeg magnetskog polja od 10 Hz koje raste tokom 4 h i u konačnici doseže 2,70%. Primjenom polja od 1,0 Hz primjećuju se 2 nagla rasta nakon pola sata te nakon 2 h kada je otpuštanje približno onom u polju pri 10 Hz i iznosi oko 1,35%, nakon čega dolazi do stagnacije i otpuštanje se zadržava na istom nivou. Primjenom oscilirajućeg magnetskog polja od 0,1 Hz prvi porast se primjećuje nakon 20 min i iznosi 0,40% nakon čega otpuštanje gotovo linearno raste sve dok u konačnici ne dosegne 1,90%. Bez utjecaja magnetskog polja se primjećuju 2 značajnija rasta nakon 50 min (0,60%) i nakon 3 h (1,40%). Nakon 4 h otpuštanje ostaje na istoj razini. Primjećujemo da je otpuštanje primjenom izmjeničnog magnetskog polja od 10 Hz dvostruko veće u usporedbi s oslobađanjem bez primijenjenih magnetskih polja (2,70% naspram 1,30%), kao i prilikom otpuštanja kvercetina. Očito je da je snaga stalnog magnetskog polja i frekvencija izmjeničnog polja svakako povezana s ponašanjem mesoporoznih magnetitnih nanočestica u viskoznom mediju. Čestice se okreću zbog zakretnog momenta izazvanog oscilirajućim magnetskim poljem. Sveukupni učinak je slabljenje interakcija međučestica zbog sada povećanih udaljenosti među česticama te bržeg i glatkog oslobađanja molekula flavonoida iz unutrašnjosti magnetitnih nanočestica. S druge strane, rotacija nanočestica je vrhunska u relativno jakom trajno magnetskom polju od 0,19 T. Kinetika konačnog otpuštanja ovisi dakle o doprinosu dvaju suprotnih učinaka. Kombiniranjem permanentnog magnetskog polja 0,19 T i oscilirajućeg magnetskog polja od 10 Hz oslobađanje se povećava, dok su

kombinacije istog trajnog magnetskog polja s dvije niže frekvencije smanjene kinetike oslobađanja. Dakle, pokazano je da se kombinacijom permanentnog i oscilirajućih magnetskih polja može kontrolirati otpuštanje lijeka.

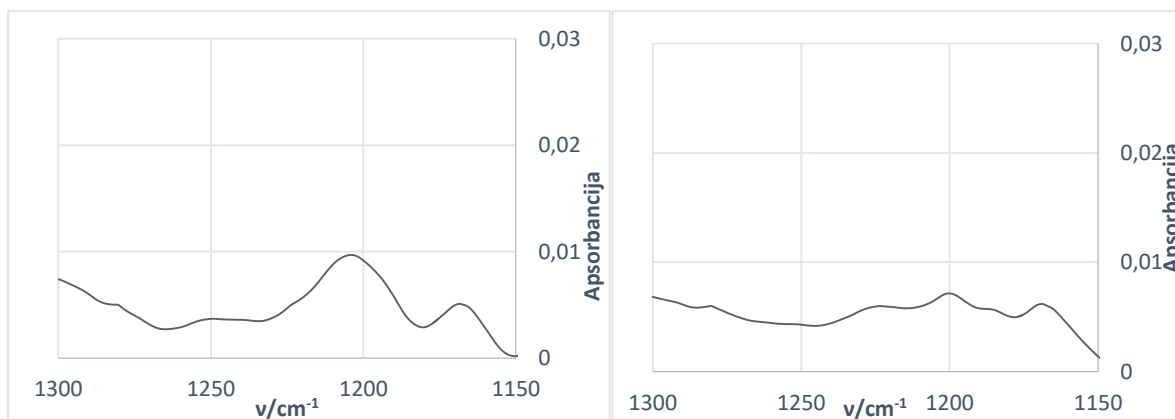
## 4.9. Rezultati FTIR analize nanočestica s ugrađenim flavonoidima

Rezultati FTIR analize magnetitnih nanočestica ugrađenim flavonoidima pokazuju vrpce u području valnih brojeva između  $1300\text{ cm}^{-1}$  i  $1150\text{ cm}^{-1}$ . Kod sva tri flavonoida prisutna je vrpca pri  $1165\text{ cm}^{-1}$  koju pripisujemo C-O rastezanju u fenolu i vrpca pri  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Kod kvercetina vrpca pri  $1270\text{ cm}^{-1}$  označava C-O rastezanje u arilnom eternom prstenu<sup>[35]</sup>. Kod magnetitnih nanočestica nisu prisutne vrpce pri spomenutim valnim brojevima. FTIR analiza potvrđuje uspješnost ugrađivanja flavonoida u magnetitne nanočestice.



Slika 24. (lijevo) IR spektar magnetitnih nanočestica u području valnih brojeva između  $1300\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$

Slika 25. (desno) IR spektar magnetitnih nanočestica ugrađenih kvercetinom u području valnih brojeva između  $1300\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$



Slika 26. (lijevo) IR spektar magnetitnih nanočestica ugrađenih miricetinom u području valnih brojeva između  $1300\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$

Slika 27. (desno) IR spektar magnetitnih nanočestica ugrađenih miricitrinom u području valnih brojeva između  $1300\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$

## **5. ZAKLJUČAK**

Pokazali smo jednostavnu reproducibilnu metodu za sintezu mesoporoznih magnetitnih nanočestica koje istodobno posjeduju veliku magnetizaciju, monomodalnu usku distribuciju veličine i svojstva površine koja potvrđuju njihovu mesoporoznost. Flavonoidi su bili uspješno ugrađeni što je potvrđeno FTIR analizom i mjerenjem zeta potencijala. Najveću mogućnost ugradnje, kao i reproducibilnost ugradnje pokazao je kvercetin. Kontrola oslobađanja flavonoida iz mesoporoznih magnetitnih nanočestica pomoću permanentnog slabog vanjskog magnetskog polja od 0,19 T te oscilirajući s vrlo niskom frekvencijom (10 Hz) pokazala se uspješnom, pogotovo kod kvercetina koji je bio otpuštan u najvećoj količini. Zaključak ovog rada je da mesoporozni materijali imaju veliki potencijal kao nosači hidrofobnih lijekova, a prednost magnetitnih nanočestica je mogućnost utjecaja magnetskog polja.

## 6. POPIS SIMBOLA

SEM - pretražna elektronska mikroskopija (eng. *scanning electron microscopy*)

BET - Brunauer-Emmet-Teller analiza (eng. *Brunauer-Emmet-Teller analysis*)

FTIR - infracrvena spektroskopija Fourierovom transformacijom (eng. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)

UV/VIS – ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (eng. *Ultraviolet-visible spectroscopy*)

IUPAC – Međunarodna unija za čistu i primjenjenu kemiju (eng. *The International Union of Pure and Applied Chemistry*)

PBS - fosfatni pufer (eng. *phosphate buffer saline*)

PEG – polietilen glikol (eng. *polyethylene glycol*)

XRPD - rendgenska difrakcija u prahu (eng. *X-ray powder diffraction*)

## 7. LITERATURA:

1. S. Pekkarinen, A. Hopia, M. Heinonen, "Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate", *J Sci Food Agric* 79 (1999) 499
2. H. Pool, D. Quintanar, J. D. Figueroa, C. M. Mano, J. E. H. Bechara, L. A. Godínez, S. Mendoza, "Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles", *J. Nanomater* (2012) 1-12.
3. D. Bennet, S. Kim, *Nanotechnology and Nanomaterials in: Ali Demir Sezer "Application of Nanotechnology in Drug Delivery"*, (2014) 258
4. N. Han, Y. Wang, J. Bai, J. Liu, Y. Wang, Y. Gao, T. Jiang, W. Kang, S. Wang, "Facile synthesis of the lipid bilayer coated mesoporous silica nanocomposites and their application in drug delivery", *Micropor. Mesopor. Mater.* 219 (2016) 209-218
5. I. Filipović, S. Lipanović, "Opća i anorganska kemija 2. dio: kemijski elementi i njihovi spojevi", Školska knjiga, 8. Izdanje (1991) 1021
6. <http://journals.iucr.org/j/issues/2014/04/00/vh5001/vh5001fig1.html> (pristup 13.8.2018.)
7. B. Luo, S. Xu, W. Wang, S. Wang, J. Guo, Y. Lin, D. Zhao, C. Wang, "Mesoporous Biocompatible and Acid-Degradable Magnetic Colloidal Nanocrystal Clusters with Sustainable Stability and High Hydrophobic Drug Loading Capacity", *American Chemical Society* vol 5. No 2. (2011) 1428-1435
8. Z. Li, L. Wei, M. Y. Gao, H. Lei, "One-Pot Reaction to Synthesize Biocompatible Magnetite Nanoparticles", *Adv. Mater.* 17 No 8. (2005) 1002
9. W. Wu, X. H. Xiao, S. F. Zhang, H. Li, X. D. Zhou, C. Z. Jiang, "One-pot reaction and subsequent annealing to synthesis hollow spherical magnetite and maghemite nanocages", *Nanoscale Res. Lett.* 4 (2009) 926
10. W. Wu, X. H. Xiao, F. Ren, S.F. Zhang, C. Z. Jiang, "A comparative study of the magnetic behaviour of single and tubular clustered magnetite nanoparticles", *J. Low Temp. Phys.* 168 (2012) 306
11. <https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid> (pristup 13.8.2018.)

12. K. Robards, X. Li, M. Antolovich, S. Boyd, "Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids", *J sci Food Agric* 75 (1997) 87
13. Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 1603-1608
14. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Flavon.svg> (pristup 13.8.2018.)
15. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoid> (pristup 13.8.2018.)
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin#section=Top> (pristup 13.8.2018.)
17. <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Quercetin.svg> (pristup 13.8.2018.)
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808895/> (pristup 13.8.2018.)
19. M. A. Read „Flavonoids: Naturally occurring anti-inflammatory agents“ *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 235–237
20. F.O. Raelletii, N. Maggiano. F.G. Serra, R. Ricci, L.M. Larocca, P. Lanza, G. Scambia, A. Fattorossi, A. Cappelli, M. Piantelli, „Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primari coloretact tumors“, *Int. J. Cancer* 85, (2000) 438
21. S. Chirumbolo “The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function “*Inflamm. Allergy Drug Targets* 9 (2010) 263–285
22. R.Y.Huang, Y.L. Yu, W.C. Cheng, C.N. OuYang , E.Fu, C.L.Chu:” Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function” *J. Immunol.* 184 (2010) 6815–6821
23. <https://en.wikipedia.org/wiki/Myricetin#/media/File:Myricetin.png> (pristup 13.8.2018)
24. Y. Yao, G.Lin, Y. Xie, P.Ma, G.Li, Q.Meng, T.Wu “Preformulation studies of myricetin: A natural antioxidant flavonoid”, *Pharmazie.* 69(2014):19–26
25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4772053/> (pristup 13.8.2018.)
26. J. Mercedes, F. Garcia-Carmona, „Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase“, *J Sci Food Agric* 79 (1999) 1993

27. <https://en.wikipedia.org/wiki/Myricitrin> (pristup 13.8.2018.)
28. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002755> (pristup 13.8.2018.)
29. M. Pereira; I.P. Siba; L.R. Chioca; D. Correia; M.A.B.F. Vital; M.G. Pizzolatti; A.R.S. Santos; R. Andreatini “Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (2011) 1636–1644
30. S. Qi, Z. Feng, Q. Li, Z. Qi, Y. Zhang, “Myricitrin Modulates NADPH Oxidase-Dependent ROS Production to Inhibit Endotoxin-Mediated Inflammation by Blocking the JAK/STAT1 and NOX2/p47phox Pathways” *Oxidative Medicine & Cellular Longevity* (2017) 1-20
31. H. Sies *Oxidative Stress: an introduction in oxidative stress oxidants and antioxidants* Academic Press (1991) 15-22
32. T. P. T. Dao, T. H. Nguyen, V. V. To, T. H. Ho, T. A. Nguyen, M. C. Dang, A new formulation of curcumin using poly(lactic-co-glycolic acid)—polyethylene glycol diblock copolymer as carrier material, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2014) 035013-035020
33. [https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta\\_potential](https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential) (pristup 13.8.2018.)
34. M. Chirita, R. Banica, A. Ieta, I. Grozescu, uperparamagnetic Unusual Behavior of Micrometric Magnetite Monodisperse Monocrystals Synthesized by Fe-EDTA Thermal Decomposition, *Particul. Sci. Technol.* 30 (2012) 354–363.
35. M. Catauro, F. Papale, F. Bollino, S. Piccolella, S. Marciano, P. Nocera, S. Pacifico, Silica/quercetin sol–gel hybrids as antioxidant dental implant materials, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 035001-035012
36. R. Aguda, C. C. Chen, Solubility of Nutraceutical Compounds in Generally Recognized as safe Solvents at 298 K, *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 7 (2016) 289-294
37. S. Cai, P. Zhang et al., Determination and correlation of the solubility of myricetin in ethanol and water mixtures from 288,15 to 323,15 K, *Phys. Chem. Liquids* 55 (2017) 27-37



38. R. Shimizu, H. Shimabaxashi, M. Moriwaki, Enzymatic Production of Highly Soluble Myricitrin Glycosides Using beta-Galactosidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2006) 940-948

## 8. ŽIVOTOPIS

Marina Punčec, [REDACTED] Nakon završetka osnovne škole Dragutina Domjanića upisuje gimnaziju Tituša Brezovačkog koju završava 2011. godine s vrlo dobrim uspjehom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2013. godine.