



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Kristian Nakić

Student 1. godine Poslijediplomskog sveučilišnog studija Kemija

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

Izrađeno prema radu:

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

Kemijski seminar I

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija, smjer Analitička kemija

Zagreb, ožujak 2024.

Ovaj seminar izrađen je prema navedenom radu izvornog naslova *Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Sea Lavender (Limonium pruinatum L. Chaz.) extract: characterization, evaluation of anti-skin cancer, antimicrobial and antioxidant potentials.*²

Kazalo

1. Uvod	1
2. Prikaz odabrane teme	2
2.1. Nanotehnologija i nanočestice u općim crticama	2
2.1.1. Nanotehnologija – definicija i povijesni osvrt	2
2.1.2. Nanočestice	3
2.1.2.1. <i>Definicija nanočestica</i>	3
2.1.2.2. <i>Podjela nanočestica</i>	3
2.1.3. Priređivanje nanočestica	4
2.1.3.1. <i>Opća podjela načina priređivanja nanočestica</i>	4
2.1.3.2. <i>Priređivanje nanočestica metalnih oksida</i>	5
2.1.3.2.1. <i>Klasične metode</i>	5
2.1.3.2.2. <i>Zelena sinteza</i>	7
2.2. Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida korištenjem ekstrakta morske lavande (Limonium pruinosum L. Chaz.)	9
2.2.1. Kratak teorijski osvrt o nanočesticama cinkova oksida	9
2.2.1.1. <i>Uvod u nanočestice cinkova oksida</i>	9
2.2.1.2. <i>Zelena sinteza sinteza nanočestica cinkova oksida</i>	10
2.2.2. Odabir biljke – morska lavanda	11
2.2.3. Materijali i metode	11
2.2.3.1. <i>Sakupljanje i obrada biljnog materijala</i>	11
2.2.3.2. <i>Priređivanje vodenog biljnog ekstrakta</i>	12
2.2.3.3. <i>Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida</i>	12
2.2.3.4. <i>Karakterizacija nanočestica cinkova oksida</i>	12
2.2.3.5. <i>Utvrđivanje citotoksičnosti / antitumorskog djelovanja</i>	13
2.2.3.6. <i>Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti</i>	14
2.2.3.7. <i>Utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti</i>	14
2.2.4. Rezultati i rasprava	15
2.2.4.1. <i>Karakterizacija nanočestica cinkova oksida</i>	15
2.2.4.1.1. <i>UV-Vis spektrofotometrija</i>	15
2.2.4.1.2. <i>Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR)</i>	16
2.2.4.1.3. <i>Fitokemijski probir</i>	17
2.2.4.1.4. <i>Utvrđivanje morfologije i veličine čestica</i>	17
2.2.4.1.5. <i>Difrakcija rendgenskog zračenja (XRD)</i>	18

2.2.4.1.6. Termogravimetrija	19
2.2.4.2. Utvrđivanje citotoksičnosti / antitumorskog djelovanja	20
2.2.4.3. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti	21
2.2.4.4. Utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti.....	22
3. Zaključak	24
4. Literaturni izvori	25

1. Uvod

Napredak nanotehnologije, osobito posljednjih godina, omogućio je razvoj i sintezu nanočestica s jedinstvenim fizikalnim i kemijskim svojstvima koja su prikladna za razne primjene u mnogim područjima, napose u biomedicini. Posebno su zanimljive nanočestice metalnih oksida, zahvaljujući svojim iznimnim svojstvima koja ih drastično razlikuju od svojstava koje pokazuju iste tvari krupnijih čestica.¹ Među takvim metalnim oksidima ističe se cinkov oksid čije nanočestice pokazuju antimikrobnu, protuupalnu, antioksidacijsku i antitumorsku aktivnost.² Upotreba cinkova oksida seže daleko prije razvoja nanotehnologije – njegova primjena u obliku masti za kožu opisana je još u doba Rimskog carstva.³ Zahvaljujući svojim optičkim svojstvima u 18. stoljeću se počeo upotrebljavati kao bijeli pigment,³ a u novije se vrijeme upotrebljava kao aktivna tvar kod kozmetičkih sredstava za zaštitu od Sunčevog zračenja.⁴

Multifunkcionalnost cinkova oksida leži na brojnim zanimljivim svojstvima – piezo- i piroelektričnost, široki raspon apsorpcije ultraljubičastog zračenja, visoka fotostabilnost, biokompatibilnost i biorazgradivost. Cinkov oksid moguće je prirediti s velikom raznolikošću u strukturi, obliku odnosno veličini čestica što u konačnici određuje njegova svojstva, a time i primjenu u raznim poljima znanosti i tehnologije. Kako oblik, veličina i struktura čestica izravno ovise o uvjetima njegova dobivanja, tako su sintetske metode predmet trajno rastućeg interesa.⁴

Klasični, odnosno dosadašnji postupci priređivanja nanočestica metalnih oksida učinkoviti su, međutim skupi su i uključuju upotrebu toksičnih supstancija koje se mogu lako adsorbirati na površinu nastalih nanočestica. Da bi se nadišli ovi problemi koji kontraindiciraju primjenu u biomedicini, sve veću pozornost privlače zelene sinteze zbog upotrebe ekološki prihvatljivih i netoksičnih kemikalija. U ovu svrhu koriste se različiti biopolimeri, biljni ekstrakti, alge, površinski aktivni biosurfaktanti i dr.,¹ koji se pokazali višestruko korisnima. Uspostavilo se da je pomoću navedenih tvari moguće uspješno modificirati površinu nastalih nanočestica te kontrolirati njihovu veličinu i morfologiju što ih u konačnici čini biokompatibilnima, biorazgradivima i neotrovnima.⁵ Stoga, kao ogledni primjerak novih, jeftinih i ekološki prihvatljivih načina dobivanja nanočestica s velikom mogućnošću primjene, ovaj seminarski rad prikazuje sintezu i karakterizaciju nanočestica cinkova oksida korištenjem ekstrakta morske lavande te procjenu antitumorskog, antimikrobnog i antioksidacijskog potencijala.²

2. Prikaz odabrane teme

2.1. Nanotehnologija i nanočestice u općim crticama

2.1.1. Nanotehnologija – definicija i povijesni osvrt

Daleko prije moderne znanosti i poznavanja građe tvari nanočestice su uživale svoju primjenu kao materijal u čovjekovu svakodnevnom životu. Najraniji zabilježeni primjer nanomaterijala seže u doba antike, kada se staklo bojilo nanočesticama zlata. Drugi primjer povijesne upotrebe nanočestica jest ugljik u sastavu čađe, koji se posljednjih 100 godina rabi kao ojačavajuće punilo u industriji automobilskih guma.⁶

Unatoč dugoj uporabi nanočestica, nanotehnologija je kao znanstvena disciplina, koja obuhvaća dizajn, karakterizaciju i primjenu tvari funkcionalno ustrojenih na nanorazini (područje veličina od 1 do 100 nm) započela svoj sustavni razvoj tek od druge polovine 20. stoljeća. Predstavljena je 1959. godine na čuvenom predavanju R. P. Feynmana – *Mnogo je mjesta na dnu!* (eng. *There's Plenty of Room at the Bottom!*). Feynman je predvidio postojanje materijala čija se proizvodnja i svojstva kontroliraju na razini atoma i molekula, s mogućnošću njihove široke primjene.⁷ Sljedeće je godine na istu temu dao glasovitu izjavu koja se s vremenom pokazala točnom – *Načela fizike, koliko znam, ne govore protiv mogućnosti pomicanja tvari atom po atom. To nije pokušaj pobijanja nekog od zakona; u načelu je to nešto što se može učiniti, no u praksi se nije izvelo budući da smo mi tako veliki.*⁸ Sam naziv *nanotehnologija* ušao je u primjenu 1974. godine, kada ga je skovao Norio Tanaiguchi, referirajući se na mogućnost preciznog inženjeringa materijala na nanorazini, potaknutog potrebama elektroindustrije.⁹

Kako je vrijeme protjecalo, tako su se sve češće nizale nove prekretnice te revolucionarna znanstvena i tehnološka dostignuća u ovoj mladoj disciplini. Početkom osamdesetih godina 20. stoljeća ruski znanstvenici A. I. Ekimov i Alexei A. Onushchenko priredili su tzv. kvantne točke – nanokristalne čestice poluvodičkih svojstava, izgrađene od 100 do 100 000 atoma, raspona veličina čestica 1,5-10 nm. Zahvaljujući svojim iznimnim fizikalnim i kemijskim svojstvima, kvantne točke našle su raširenu primjenu u biomedicini i optoelektronici.¹⁰ R. E. Smalley, R. F. Curl i H. W. Kroto 1985. godine priredili su C60 fullerenu, novu alotropsku modifikaciju ugljika čije šuplje i sferične čestice mogu biti manje i od jednog nanometra.¹¹ Nova revolucija u nanotehnologiji uslijedila je 1986. godine, kada su G. Binnig, C. F. Quate i C. Gerber izumili mikroskop atomskih sila (AFM) dok je iste godine E. K. Drexler

objavio knjigu *Strojevi za stvaranje* (eng. *Engines of Creation*), jednu od prvih publikacija o nanotehnologiji.⁷

Sve brži razvoj znanosti i tehnologije rezultirao je sve češćim otkrićima u ovome polju pa su na prijelazu s 20. na 21. stoljeće priređeni novi i vrlo perspektivni nanomaterijali – S. Iijima otkrio je nanocjevčice,¹² a A. K. Gejm i K. S. Novosjolov su izolirali grafen.^{7,13} Daljnja proizvodnja novih nanomaterijala, koja se zasniva na manipulacijama na atomskoj i molekulskoj razini te na mogućnosti preciznog podešavanja svojstava tvari reguliranjem njihove veličine, ovu je disciplinu učinila trajnim predmetom znanstvenog i gospodarskog interesa. Očekuje se da će nanotehnologija u sprezi s drugim tehnologijama, poput biotehnologije i informacijskih tehnologija, rezultirati opsežnim pozitivnim promjenama u istraživanju i razvoju novih materijala, medicini, energetici i zaštiti okoliša.⁷

2.1.2. Nanočestice

2.1.2.1. Definicija nanočestica

Nanočestice su široka klasa tvari čija veličina iznosi manje od 100 nm, a ovisno o njihovom obliku, mogu biti 0D, 1D, 2D ili 3D.¹⁴ Važnost nanočestica postala je nezaobilazna u trenutku kada se ustanovilo da njihova veličina izravno utječe na ukupna fizikalna i kemijska svojstva¹⁴ zbog čega mogu pokazivati mnogostruku funkcionalnost.⁷ Omjer površine i volumena nanočestica mnogostruko je veći u usporedbi s makročesticama. Elektronska struktura nano- i makročestica različita je, što se odnosi i na generalnu strukturu tvari – mikroskopsku, molekulsku, atomsku ili kristalnu. Na nanorazini se javlja nasumično gibanje čestica, a frekvencije i brzine veće su u odnosu na makrorazinu. Pri opisu fenomena koje pokazuju nanočestice upotrebljava se kvantnomehanički model umjesto klasično-mehaničkog modela.⁷ Zahvaljujući brojnim povoljnim svojstvima nanočestice imaju široku primjenu u raznim poljima, poput medicine, fotonike, elektronike i agrikulture.¹⁵

2.1.2.2. Podjela nanočestica

Nanočestice se mogu svrstati u više kategorija na osnovu različitih kriterija – kemijskih ili fizikalnih svojstava, morfologije, strukture te veličine. Najčešća podjela je s obzirom na kemijski sastav, stoga postoje organske i anorganske nanočestice.^{14,16} Organske nanočestice sačinjene su od proteina, ugljikohidrata, lipida, polimera odnosno drugih organskih spojeva koje su pretežito neotrovne, biorazgradive i u određenim slučajevima unutar svoje strukture

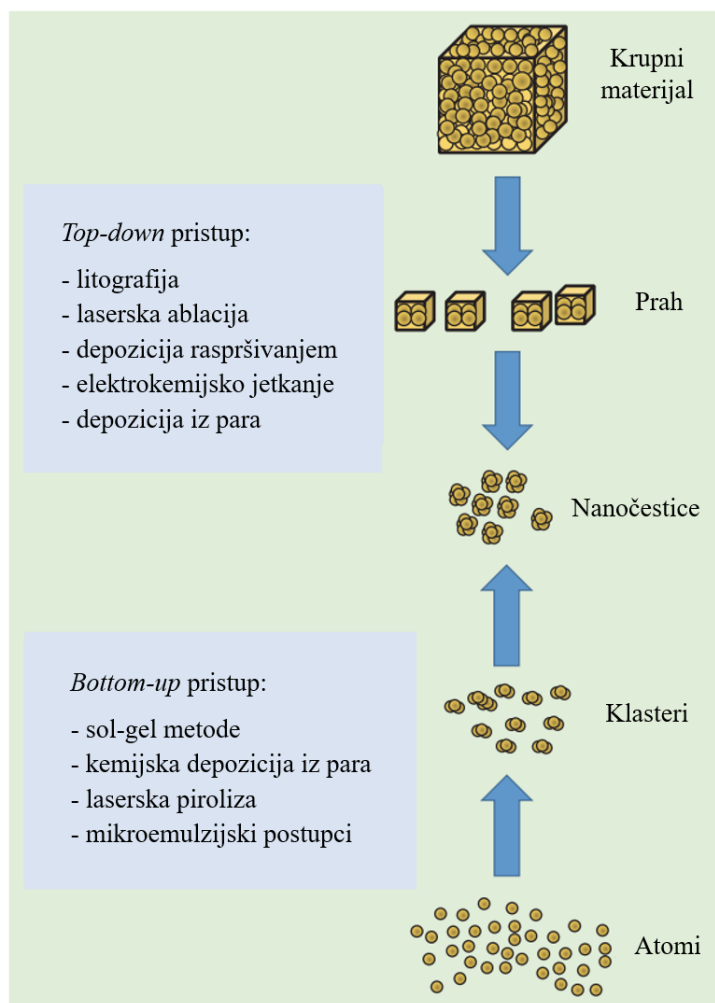
mogu sadržavati šupljinu, što je slučaj kod liposoma. Organske nanočestice formiraju se u prvom redu zahvaljujući nekovalentnim interakcijama koje ih u osnovi čine labilnima, stoga se mogu lakše eliminirati iz tijela. Uporaba ove klase nanočestica temelji se na njihovim svojstvima poput sastava, morfologije, kapaciteta ispunjavanja šupljina te stabilnosti. U današnje su vrijeme organske nanočestice našle svoju primjenu u područjima biomedicine – ciljana terapija i liječenje raka.¹⁶

S druge strane, postoje anorganske nanočestice koje se u cijelosti sastoje iz elementarnog ugljika, poput fullerena, grafena ili ugljičnih nanocjevčica, i one koje u svome sastavu ne posjeduju elementarni ugljik niti organske spojeve. Primjer za potonje jesu metalne, keramičke i poluvodičke nanočestice.¹⁴ Metalne se nanočestice priređuju iz metalnih prekursora i mogu biti mono-, di- ili polimetalnog sastava. Budući da metali posjeduju jedinstvena toplinska, optička, električka, magnetska i biološka svojstva njihove nanočestice važne su u razvoju nanouređaja s fizikalnom, kemijskom, biološkom, biomedicinskom i farmaceutskom primjenom. Keramičke nanočestice anorganski su spojevi sačinjeni od karbonata, karbida, fosfata ili oksida metala, odnosno polumetala,¹⁷ a primjenjuju se u biomedicini zbog izrazite stabilnosti,¹⁸ no primjenu pronalaze i u katalizi, fotonici ili optoelektronici.¹⁶ Posljednja anorganska podskupina pripada poluvodičkim nanočesticama, tvarima sačinjenima od poluvodiča koji posjeduju metalna i nemetalna svojstva. Primjeri su kadmijev telurid, željezovi oksidi (Fe_xO_y), cinkov oksid i cinkov sulfid.¹⁹ Zahvaljujući svojim poluvodičkim svojstvima primjenjuju se u optici, elektronici i fotokatalizi.¹⁶

2.1.3. Priređivanje nanočestica

2.1.3.1. Opća podjela načina priređivanja nanočestica

Nanočestice se mogu sintetizirati, odnosno prirediti na dva osnovna načina – fizikalnim ili kemijskim putem. Fizikalne metode podrazumijevaju dobivanje nanočestica usitnjavanjem većih polaznih čestica (eng. *top-down*) i to najčešće mehaničkim usitnjavanjem u kugličnom mlinu, laserskom ablacijom, depozicijom raspršivanjem ili depozicijom iz para. S druge strane, kemijske metode uzimaju u obzir priređivanje spoja iz svojih preteča (tzv. prekursora) koji se izdvaja iz otopine ili plinovite faze u nanočestičnoj formi (eng. *bottom-up*).²⁰ U potonje spadaju sol-gel metode, kemijska depozicija iz para, laserska piroliza te mikroemulzijski postupci.²¹ Opći prikaz dobivanja nanočestica sažet je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz aktualnih metoda priređivanja nanočestica. ²¹

2.1.3.2. Priređivanje nanočestica metalnih oksida

2.1.3.2.1. Klasične metode

Uobičajeni načini sinteze nanočestica metalnih oksida temelje se na spomenutom *bottom-up* pristupu. Tu prevladavaju kemijsko taloženje, “mokri” postupak, solvotermalne, hidrotermalne, sol-gel metode, pirolitičke metode u čvrstom stanju, toplinska razgradnja te mikrovalno-potpomognuta sinteza. ¹ Slijedi sažeti pregled navedenih metoda:

- Kemijsko taloženje* zasniva se na dodavanju taložnog reagensa, poput otopine amonijaka, natrijeva hidroksida ili ureje, vodenoj otopini metalnog prekursora. Dobiveni talog zagrijava se ili žari, pri čemu nastaju odgovarajuće nanočestice metalnog oksida. Koliko god je povoljno što se ovom metodom mogu dobiti vrlo malene čestice s malim rasponom veličina te s visokom čistoćom, problem nastaje zbog

niske kristaličnosti. Na ovaj način se dobivaju nanočestice ZnO, CeO₂, Fe₂O₃, TiO₂, MgO i NiO.¹

- b) “Mokri” kemijski postupci temelje se na taloženju oksida taložnim reagensom u prisutnosti aditiva čija je svrha stabiliziranje nastalih nanočestica – primjerice, uz dodatak škroba kao stabilizatora. Na ovaj se način dobivaju nanočestice ZnO čija je svrha ciljano otpuštanje aktivne farmaceutske tvari pri liječenju raka.²² Istim putem priređuju se i nanočestice CeO₂, Fe₂O₃, TiO₂, MgO, NiO, ZrO te CdO.¹
- c) Hidrotermalna sinteza ima raširenu upotrebu zbog mogućnosti precizne kontrole veličine i oblika dobivenih čestica kao i mogućnosti smanjenja neželjenog agregiranja. Štoviše, ova metoda pogodna je za sinteze čestica visoke čistoće i na velikoj skali. S druge strane, sinteza je dugotrajna i nerijetko zahtijeva dodatnu obradu dobivenog produkta. Postupak započinje miješanjem vodene otopine prekursora i taložnog reagensa u teflonskom reaktoru, slijedi prilagođavanje pH te, konačno, hermetičko zatvaranje reaktora unutar autoklava od nehrđajućeg čelika. Autoklav se zagrijava pri konstantnoj temperaturi (unutar raspona 80-200 °C) određeno vrijeme (npr. 1-20 h).²³ Produkt se nekoliko puta ispiri, zatim žari. Na ovaj način mogu se dobiti iste nanočestice kao i kod “mokrih” kemijskih postupaka.¹
- d) Solvotermalna sinteza vrlo je slična hidrotermalnoj, s osnovnom razlikom u izboru medija: umjesto vode rabe se različita organska otapala. Reakcijska smjesa zagrijava se pri konstantnoj temperaturi unutar raspona 100-1000 °C i tlaku u rasponu 1-10 000 bar.²⁴ Otapala koja se obično rabe jesu dietanolamin ili metanol za sintezu ZnO, etanol za sintezu α -Fe₂O₃, butan-1,4-diol za sintezu γ -Fe₂O₃, toluen za sintezu TiO₂ te etilenglikol za sintezu Fe₂O₃. U pojedinim slučajevima potreban je dodatak stabilizatora, a u slučaju da se želi proizvesti biokompatibilne čestice za primjenu u medicini, neophodno je paziti na izbor netoksičnog otapala.^{1,25}
- e) Sol-gel spada među najraširenije konvencionalne i industrijske metode sinteze širokog raspona nanočestica metalnih oksida, pri tome nudeći dobro kontroliranje veličine čestica, visoku čistoću i homogenost.²⁶ Ova metoda povoljna je i zbog niskotemperaturnih uvjeta sinteze, međutim problem predstavljaju uporaba organskih otapala te dostupnost potrebnih prekursora. Formiranje nanočestica temelji se na nastajanju homogenog sola iz prekursorâ koji se potom prevodi u gel, za čime slijedi eliminacija otapala te, konačno, sušenje. Metalni oksidi čije se nanočestice mogu prirediti na opisani način su ZnO, α -Fe₂O₃, MgO, NiO te CdO.^{1,27}

- f) *Piroliza* se odnosi na dobivanje nanočestica metalnih oksida toplinskom razgradnjom prekursora. Reakcija se provodi u čvrstom stanju, a kontrola veličina čestica postiže se preciznim prilagođavanjem temperature reaktora. Primjerice, preciznom kontrolom temperature reakcijske smjese moguće je dobiti čestice ZnO u rasponu veličina 8-35 nm.^{28,29}
- g) *Toplinska razgradnja* srodna je pirolizi, s razlikom u vrsti prekursora i mediju reakcije. Metalni prekursor, najčešće organometalni spoj, zagrijava se iznad temperature raspada u organskom otapalu visokog vrelišta, u inertnoj atmosferi i u prisutnosti površinskih stabilizatora.³⁰ Prednost metode jesu činjenice da su dobivene nanočestice pretežito monokristalne te da nisu potrebni dodatni koraci, poput završnog žarenja/zagrijavanja. Međutim, reakcijski prinos je nizak. Ovom metodom moguće je proizvesti nanočestice ZnO, Fe₂O₃, MgO, NiO, CdO, CeO₂ i TiO₂.^{1,30}
- h) *Mikrovalno-potpomognuta sinteza* u posljednje vrijeme plijeni najviše pozornosti glede sinteze nanočestica metalnih oksida. Za razliku od klasičnih načina zagrijavanja reakcijske smjese u pećima, pri čemu se stupnjevito isprva zagrijava stijenka reaktora, a tek onda i reakcijski medij, mikrovalno zračenje izravno i pretežito ujednačeno zagrijava reakcijski medij. Takva reakcija stoga je za nekoliko redova veličina brža, odnosno traje mnogostruko kraće.³⁰ Nedostatak mikrovalno-potpomognute sinteze jest nemogućnost provođenja na velikoj skali zbog teške kontrole nad temperaturom i tlakom. Ipak, visoki reakcijski prinos, kratko vrijeme sinteze (visoka brzina kemijske reakcije) te niska razina stvaranja aglomerata čine ovu tehniku visoko perspektivnom u daljnjim istraživanjima. Na ovaj način moguće je dobiti nanočestice svih do sada spomenutih metalnih oksida.¹

2.1.3.2.2. Zelena sinteza

Nbrojeni su načini na koje se nanočestice metalnih oksida mogu upotrijebiti, međutim ako bi njihova primjena bila u medicini, biomedicini ili farmaceutici vrlo je važno da su čestice biokompatibilne i netoksične. Na tragu toga, u posljednje vrijeme veliki se interes polaže na *zelene sinteze*. Takve sinteze podliježu načelima *zelene kemije* – područja definiranog kao kemija koja osmišljava ekološki prihvatljive i održive sinteze, odnosno procese. Ideja ovakve mlade discipline jest zamijeniti supstancije i procese štetne za okoliš obnovljivim izvorima, odnosno novim pristupom sintezama s ciljem sprječavanja onečišćenja.³¹ Klasične metode, opisane u prethodnom potpoglavlju, zbog moguće uporabe/prisutnosti otrovnih supstancija,

visoke cijene izvedbe te potrebe za uporabom potencijalno otrovnih stabilizatorâ često nisu povoljne za dobivanje nanočestica metalnih oksida koji bi se primijenili u biomedicinske svrhe. Slijedeći načela zelene kemije navedeni problemi uspješno se mogu nadići – upotrebom ekološki prihvatljivih supstancija i sirovina s minimalnim neželjenim učincima zelene sinteze pokazale su se kao idealno rješenje. One uključuju korištenje raznih biopolimera, biljnih ekstrakata, algi, površinski aktivnih biosurfaktanata i drugih obnovljivih izvora koji vode prema biokompatibilnosti i biorazgradivosti.^{5,28}

Pored toga što su zelenim sintezama zadovoljeni biološki, ekološki i ekonomski uvjeti, potrebno je voditi računa da se to ne odrazi negativno na generičke parametre sinteze nanočestica. U tom smjeru, upotreba biomaterijala pokazala se izvrsnom u kontroliranju morfologije nanočestica, a dobar broj biljnih metabolita može poslužiti kao redukcijsko sredstvo te sredstvo za modifikaciju čestica. Za tu svrhu mogu se rabiti mikrobi, poput alga, gljiva i bakterija, zatim ekstrakti biljnih tkiva, kao što su list, korijen, plod ili cvijet (posjeduju tanine, polifenole, terpenoide, alkaloida, tanine, itd.), a izvrsnima su se pokazali i sljedeći biološki proizvodi: škrob, med, jaja, pektin i agaroz.³²

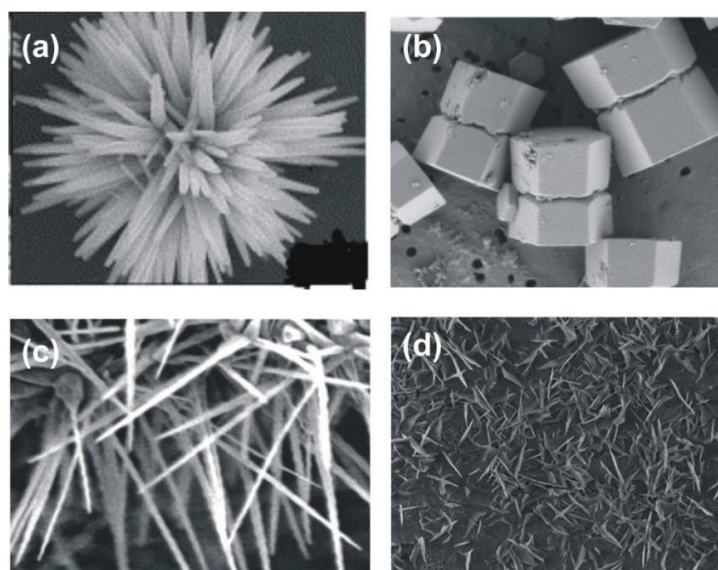
Među nabrojenim posebno se ističu biljni ekstrakti zahvaljujući zadovoljavanju gotovo svih preduvjeta za sintezu nanočestica metalnih oksida s potencijalnom primjenom u biomedicini. Fitokemikalije nose višestruku ulogu – osim što mogu poslužiti kao redukcijsko i stabilizirajuće sredstvo, one služe i oblaganju nanočestica. Obloga je ključna kako u kontroliranju veličine i oblika nanočestica tijekom sinteze, tako je važna i jer povećava biokompatibilnost i omogućuje daljnju modifikaciju čestica s primjenom u ciljanoj terapiji.³³

2.2. Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida korištenjem ekstrakta morske lavande (*Limonium pruinosum* L. Chaz.)

2.2.1. Kratak teorijski osvrt o nanočesticama cinkova oksida

2.2.1.1. Uvod u nanočestice cinkova oksida

Kristali cinkova oksida mogu se pojaviti kao jedno-, dvo- ili trodimenzijske nanočestice. Jednodimenzijske čestice najveća su skupina koja obuhvaća nanoštapiće, nanoigle, nanohelikse, nanocjevčice, nanoprstenove, nanočešljeve i nanopetlje. Dvodimenzijske čestice odnose se na nanopločice i nanokuglice (nanoperle) dok u trodimenzijske spadaju tzv. cvjetovi, maslačci, pahulje, ježinci i dr. Cinkov oksid je spoj koji može tvoriti najširu paletu različitih nanostrukture među svim poznatim tvarima.⁴ Na slici 2 prikazani su neki od najpoznatijih nanostrukture cinkova oksida.



Slika 2. Primjeri nanostrukture cinkova oksida: a) nanocvjetić, b) nanoštapići, c) i d) nanožice. Mikrografije su snimljene pretražnim elektronskim mikroskopom s emisijom polja elektrona (FE-SEM).⁴

Uz klasična nanosvojstva, poput veličine i oblika čestica, poroznosti, odnosa površine i volumena, nanočestice metalnih oksida određuju i visoka stabilnost, jednostavnost priređivanja te kontroliranja reakcijskih uvjeta i izvrsna mogućnost prodiranja u žive stanice.¹ Cinkov oksid posebno se ističe jer je netoksičan i biokompatibilan te može pokazivati raznolika svojstva u ovisnosti o veličini i obliku čestica. Odlikuje ga visoka kemijska stabilnost, visoka

foto stabilnost, visoki koeficijent elektromehaničkog sprežanja i široki raspon apsorbiranja radijacije. Budući da je klasificiran u II.-VI. poluvodiče te pokazuje visoku toplinsku i mehaničku stabilnost odličan je kandidat za primjenu u elektronici, optoelektronici i laserskoj tehnologiji. Kao tvar visoke tvrdoće i refraktornih svojstava primjenu je našao u keramici.^{4,5} Cinkov oksid nalazi se i u proizvodima široke uporabe – kremama za sunce, mastima (cinkova mast), dodacima za prehranu i dr. Njegove nanočestice pokazuju snažan antibakterijski učinak, a Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *FDA – Food and Drug Administration*) proglasila ga je novim i moćnim antitumorskim lijekom.³⁴ Pokazalo se da nanočestice cinkova oksida imaju selektivni citotoksični učinak na stanice raka na način da uzurpiraju proteinsku aktivnost koja je ovisna o cinkovim ionima.¹

Pored brojnih načina na koji se nanočestice cinkova oksida mogu primijeniti, ovaj seminarski rad osvrnut će se na potencijal njegovih antimikrobnih, antitumorskih i antioksidacijskih svojstava.²

2.2.1.2. Zelena sinteza sinteza nanočestica cinkova oksida

Neovisno o tome priređuju li se krupnije čestice ili nanočestice, pristup sintezi je univerzalan. S ciljem kontroliranja fizikalnih ili kemijskih svojstava dobivenih nanočestica potrebno je precizno podešavati reakcijske uvjete – odabir reaktanata, njihova koncentracija i množinski omjer, temperatura, tlak, vrijeme, pH i ionska jakost. Najmanja promjena nekog od uvjeta može se drastično odraziti na konačna svojstva nastalih čestica.³⁵

Slijedi kraći literaturni pregled primjera zelene sinteze nanočestica cinkova oksida kojima je utvrđeno i antimikrobno djelovanje. Sangeetha et al. priredili su nanočestice veličine 35 nm koristeći ekstrakt aloje (*Aloe barbadensis* Mill.). Autori su zapazili nastajanje kuglastih čestica s dvostrukom ovojnicom koju su pripisali biljnom ekstraktu. Sinteza cinkova oksida uz korištenje biljnim ekstraktom rezultirala je nastajanjem nanočestica dimenzija oko 35 nm, dok je klasičnim putem moguće dobiti čestice dimenzija oko 60 nm. Zabilježeno je da se povišenjem udjela biljnog ekstrakta s 5 % na 35 % postiže iskorištenje reakcije od gotovo 100 %. Stabilnost nanočestica također je povećana pogotovo zbog prisutnosti slobodnih amino- i karboksilnih skupina koje omogućuju vezivanje za istoimene čestice.¹⁵ Ramesh et al. sintetizirali su nanočestice cinkova oksida raspona veličine čestica 20-30 nm koristeći ekstrakt biljke crna pomoćnica (*Solanum nigrum* L.), za potrebe istraživanja antibakterijske aktivnosti. Nastale čestice pokazale su izraženo antibakterijsko djelovanje protiv bakterije *Salmonella paratyphi* u odnosu na standardni antibiotik.³⁶ Li et al. proizveli su nanoštapiće cinkova oksida

veliĉine 88 nm, rabeći ekstrakt biljke kubanski origano (*Plectranthus amboinicus* Lour.). Prateći fotokatalitiĉka svojstva autori su zapazili da su nanoĉestice cinkova oksida, dobivene zelenom sintezom, uzrokovale degradaciju oneĉišćivala veću od 92,45 %, dok je u istom vremenu cinkov oksid, dobiven hidrotermalnim putem, postigao rezultat od 67,45 %.³⁷ Suresh et al. su također za potrebe fotokatalize priredili nanoĉestice cinkova oksida. Međutim, koristili su ekstrakt biljke laburnum (*Cassia fistula* L.), u ĉijem sastavu je bilo prisutno oko 11 % polifenola, i dobili su spužvaste ĉestice, raspona veliĉine ĉestica 5-15 nm.³⁸ Sundarajan et al. za potrebe istraživanja antibakterijske aktivnosti sintetizirali su nanoĉestice cinkova oksida veliĉine 100 nm, koristeći ekstrakt indijske breze (*Pongamia pinnata* L.). Ustanovljeno je da u kiselim uvjetima aromatski ugljikovodici, preko hidroksilnih skupina, tvore kompleksni spoj s cinkovim ionima. Takav spoj raspada se pri 350 °C što rezultira nastajanjem nanoĉestica cinkova oksida. Iste su pokazale antibakterijsku aktivnost inducirajući nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species, ROS*) ulaskom u stanice.³⁹

2.2.2. Odabir biljke – morska lavanda

Broj znanstvenih publikacija na temu sinteze nanoĉestica cinkova oksida upotrebom razliĉitih biljnih ekstrakata u stalnome je porastu. Međutim, do sada nije zabilježena upotreba morske lavande, *Limonium pruinosum* L. Chaz. To je biljka iz porodice vranjemilovki (plumbaginaceae) koja je prilagođena životu na staništima bogatima lako topljivim solima, poput natrijeva klorida, karbonata ili sulfata (halofit). Obitava pretežitom na priobalnim slanim moĉvarama i vapnenaĉkim klifovima. Stoga, cilj rada jest iskoristiti potencijal divljih slanah moĉvara i tipičnu mediteransku biljku – morsku lavandu – upotrijebiti za proizvodnju nanoĉestica cinkovog oksida s mogućom primjenom u biomedicini.²

2.2.3. Materijali i metode

2.2.3.1. Sakupljanje i obrada biljnog materijala

Uzorci morske lavande (*Limonium pruinosum*) sabrani su sa slanah moĉvara na Mediteranu, duž sjeverozapadne obale Egipta. Za potrebe istraživanja korišteni su korijenje, listovi i stabljike. Da bi se s njih uklonila zemlja, uzorci su pažljivo oprani prvo vodovodnom, zatim destiliranom vodom. Uslijedilo je sušenje pri 60 °C do konstantne mase, zatim mljevenje do

finog praha upotrebom električnog mlinca (Moulinex 700 W, Francuska). Praškasta biljna masa pohranjena je u hermetički zatvorene staklenke do sljedećeg korištenja.²

2.2.3.2. Priređivanje vodenog biljnog ekstrakta

Odvagano je 2 g praha morske lavande, pomiješano sa 100 mL destilirane vode te je smjesa zagrijavana 30 minuta pri konstantnoj temperaturi od 70 °C, uz stalno miješanje. pH nastalog biljnog ekstrakta iznosio je 7,84. Smjesa je profiltrirana preko Whatman filter-papira br. 1, a ekstrakt je pohranjen pri 4 °C do sljedeće upotrebe.²

2.2.3.3. Zelena sinteza nanočestica cinkova oksida

Vodena otopina cinkova acetata, $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, priređena je otapanjem izračunane mase cinkova acetata dihidrata u destiliranoj vodi. Odmjereno je 2,5 mL biljnog ekstrakta i dodano u 25 mL vodene otopine cinkova acetata. pH takve smjese iznosio je 6,13. Vodena otopina natrijeva hidroksida, $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$, dodavana je kap po kap dok pH smjese nije porastao do 8. Reakcijska smjesa miješana je 30 min pri 70 °C, a nastali bijeli talog cinkova oksida izdvojen je dekantiranjem i ispiranjem destiliranom vodom. Konačno, spoj je sušen pri 70 °C preko noći. Nastale nanočestice cinkova oksida pohranjene su u hermetizirani spremnik do karakterizacije i primjene.²

2.2.3.4. Karakterizacija nanočestica cinkova oksida

Sastav sintetiziranih nanočestica cinkova oksida potvrđen je UV/Vis spektrofotometrom s dvostrukim optičkim snopom (T70/T80 series UV/Vis Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, U.K.) u rasponu valnih duljina 200-800 nm, na osnovu karakterističnog apsorpcijskog maksimuma za nanočestice cinkova oksida.²

Funkcionalne skupine koje potječu od biljnog materijala utvrđene su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR; Nicolet iS50 FTIR Spectrometer, Termo Fischer Scientific, Japan) u rasponu valnih brojeva 400-4000 cm^{-1} , te spregnutim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS; Trace GC1310-ISQ mass spectrometer, Termo Scientific, Austin, TX, USA).²

Za utvrđivanje površinskih svojstava, elementnog sastava, veličine i oblika nastalih čestica korišteni su pretražni elektronski mikroskop (eng. *scanning electron microscope* – SEM), energijski razlučujuća rendgenska analiza (eng. *energy dispersive X-ray analysis* – EDX; JEOL, JSM IT 200, Japan), transmisijski elektronski mikroskop (eng. *transmission*

electron microscope – TEM; JEOL, JSM-1400 PLUS, Japan) i rendgenski difraktometar praha (eng. X-ray diffractometer – XRD; Bruker D8 Discover Diffractometer, USA).²

Toplinska stabilnost nanočestica ustanovljena je termogravimetrijski (termogravimetar Labsys evo Setaram, France).²

2.2.3.5. Utvrđivanje citotoksičnosti / antitumorskog djelovanja

Citotoksični učinak, odnosno antitumorsko djelovanje nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom procijenjeni su pomoću testa MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid}. Test se temelji na spektrofotometrijskom određivanju nastalog obojenja kao funkcije metaboličke aktivnosti stanica nakon što su izložene ispitivanim spojem/spojevima, u ovom slučaju nanočesticama cinkova oksida. Žuta tetrazolijeva sol (MTT) u stanicama se metabolizira, odnosno reducira u plavoljubičaste kristale formazana posredstvom staničnih enzima oksidoreduktazâ i dehidrogenazâ. S obzirom na to da mrtve stanice nemaju sposobnost pretvaranja MTT-a u formazan, intenzitet nastalog obojenja izravan je odraz vijabilnosti stanica (sposobnost za preživljavanje). Za procjenu metaboličke aktivnosti stanica, ali i procjenu otrovnosti lijekova u staničnim linijama karcinoma najčešće se rabi test MTT.^{2,40,41}

Modelne humane stanične linije raka kože (odn. tumorske stanice, A-431) i normalne humane stanične linije plućnog fibroblasta (WI-38) izloženi su različitim koncentracijama kako priređenih nanočestica, tako i samog vodenog ekstrakta morske lavande (31, 25, 62,5, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g cm}^{-3}$). U mikrotitarsku ploču s 96 jažica inokulirano je 100 μL stanica po jažici, koncentracije 1×10^{-5} stanica mL^{-1} i inkubirano s hranjivim medijem za rast stanica 24 h pri 37 °C. Medij je dekantiran, zatim je svaka jažica sa stanicama ispunjena s 0,1 cm^{-3} ispitivanog uzoraka različite koncentracije. Naznačene koncentracije nanočestica, odnosno ekstrakta, priređene su serijskim razrjeđenjima u mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*; potpuni stanični medij s dodatkom fetalnog goveđeg seruma i L-glutamina). Tri jažice ispunjene su samo medijem RPMI i poslužile su kao kontrola. Mikrotitarska ploča inkubirana je pri 37 °C određeno vrijeme, zatim su svjetlosnim mikroskopom ispitane morfološke promjene stanica. Otopina MTT-a (koncentracije 5 mg cm^{-3} u fiziološkom puferu PBS; eng. *phospate-buffered saline*) dodana je u svaku jažicu u iznosu 8-20 μL , mikrotitarska ploča temeljito je protresivana 5 min, zatim inkubirana 4 sata (pri 37 °C u atmosferi s 5 % CO_2) do formiranja formazana. Nastali formazan resuspendiran je u 200 μL dimetilsulfoksida te je sve protresivano dodatnih 5 min. Na koncu je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija pri 560

nm za svaku jažicu. Eksperiment je proveden u tri replikata (ponavljanja). Koncentracija nanočestica cinkova oksida i biljnog ekstrakta dovoljna da izazove 50 %-tnu inhibiciju rasta tumorskih stanica (A-431) određena je iz ovisnosti koncentracije i odziva – predstavljena je kao vrijednost IC_{50} (eng. *half maximal inhibitory concentration*).²

2.2.3.6. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti

Provedena su testiranja antimikrobne aktivnosti nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom, vodenog ekstrakta morske lavande i antibiotika gentamicina na 6 različitih patogenih mikroorganizama: Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ATCC 8739) i *Enterobacter aeurignosa*, patogene gljivice *Candida albicans* (ATCC 10221) i *Aspergillus flavus*.²

Antimikrobna aktivnost provedena je metodom difuzije u jažicama (eng. *well diffusion method*). Dok je još tekuć, hranjivi medij s agarom inokuliran je pojedinom mikrobnom kulturom i pušten u Petrijevoj zdjelici nekoliko minuta da očvrstne. Na taj način pripremljene su zasebne Petrijeve zdjelice s pojedinim mikrobom. Izbušen je odgovarajući broj jažica (rupa) u agaru u koje je dodano zasebno po 100 μL uzorka nanočestica, vodenog ekstrakta morske lavande i otopine gentamicina, priređeni u koncentraciji 10 mg cm^{-3} u fiziološkoj otopini (vodena otopina natrijeva klorida, $w = 0,9\%$). Petrijeve zdjelice zatim su ostavljene u hladnjaku 1 h da se omogući difundiranje ispitivanih tvari. Sve je inkubirano pri 37 °C 18-24 h za čime su izmjerene zone inhibicije. Fiziološka otopina ne pokazuje antimikrobnu aktivnost ni prema kojem patogenom soju. Gentamicin je korišten kao pozitivna kontrola.^{2,42}

2.2.3.7. Utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom i vodenog ekstrakta morske lavande utvrđena je DPPH metodom (kratica spoja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-hidrat). Serijskim razrjeđenjem priređen je niz otopinâ nanočestica i otopinâ vodenog ekstrakta u etanolu sljedećih koncentracija: 1,95, 3,9, 7,8125, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g cm}^{-3}$. U 3 mL svake od razrijeđenih otopina dodano je 1 mL otopine DPPH, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Askorbinska kiselina upotrijebljena je kao standard, a za testiranje je pripremljena i otopina DPPH bez uzoraka koja je poslužila kao kontrola. Dobivene smjese intenzivno su protresivane te ostavljene stajati pri sobnoj temperaturi 30 min. Na koncu je svakoj smjesi izmjerena apsorbancija pri 517 nm UV/Vis spektrofotometrom (UV-Vis Milton Roy, USA). Eksperiment je proveden u tri replikata (ponavljanja).²

Metoda se zasniva na promjeni boje prilikom redukcije stabilnog radikala DPPH• u neradikalni oblik DPPH-H u prisutnosti tvari koja je u stanju donirati elektron/e, poput antioksidansa. Nespareni elektron kod radikala DPPH• uzrokuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja. Djelovanjem antioksidansa na DPPH• dolazi do sparivanja elektrona te nastaje DPPH-H koji pokazuje slabiju apsorpciju elektromagnetskog zračenja – intenzivna tamnoljubičasta boja mijenja se u žutu. Stoga, smanjenje navedene apsorpcije funkcija je antioksidacijskog potencijala određene tvari. Izrazom 1 prikazano je kako se određuje postotak redukcije DPPH• koji se još naziva i kapacitet “hvatanja” radikala (RSC, eng. *radical scavenging capacity*). A_A odnosi se na apsorpciju otopine s dodanim antioksidansom izmjerena 1 h nakon dodatka, a A_K jest apsorpcija kontrolnog uzorka.^{2,43}

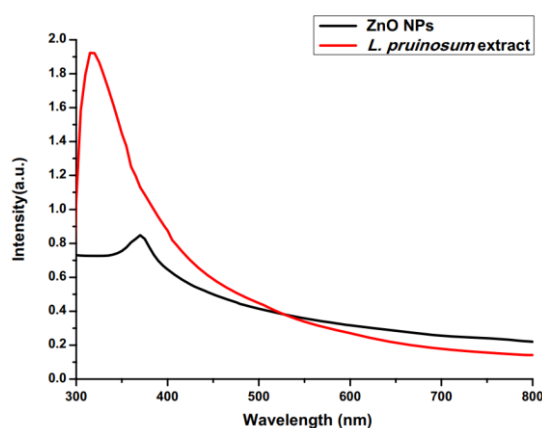
$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_K - A_A}{A_K} \times 100 \quad (\text{Izraz 1})$$

2.2.4. Rezultati i rasprava

2.2.4.1. Karakterizacija nanočestica cinkova oksida

2.2.4.1.1. UV-Vis spektrofotometrija

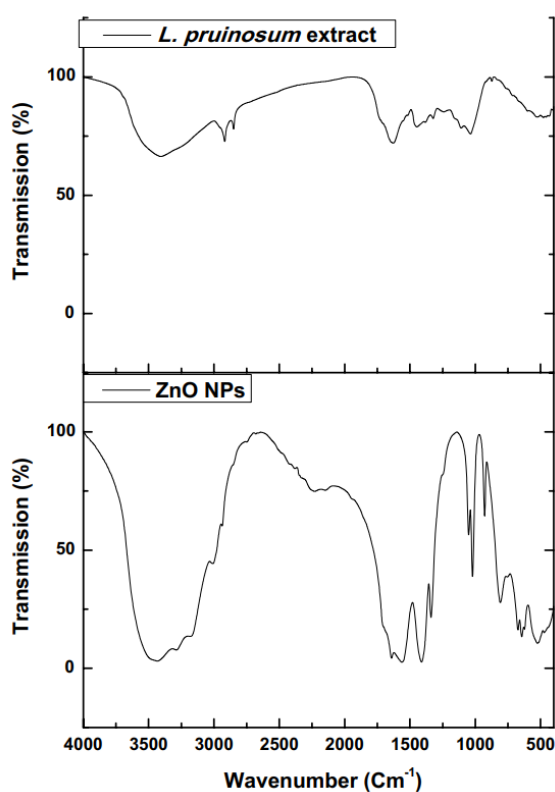
Da bi im se snimio UV-Vis spektar, dobivene nanočestice cinkova oksida suspendirane su u deioniziranoj vodi i ostavljene u ultrazvučnu kupelj na 10 min. Na spektru (slika 3) se može uočiti izraženi apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini oko 370 nm tipičan za nanočestice cinkova oksida,⁴⁴ što potvrđuje njihovo uspješno nastajanje. Spektar ekstrakta pokazuje apsorpcijski maksimum pri 320 nm što ukazuje na prisutnost fenola tipičnih za biljku morske lavande.²



Slika 3. UV-Vis spektar nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom (*ZnO NPs*) i vodenog ekstrakta morske lavande (*L. pruinosa extract*).²

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

FT-IR spektar prikazan je na slici 4. Karakteristični apsorpcijski maksimum u infracrvenom spektru pri 523 cm^{-1} odnosi se na istežanje Zn–O veze. Maksimumi pri 3433 i 3288 cm^{-1} kod uzorka nanočestica cinkova oksida ukazuju na prisutnost hidroksilnih (OH) skupina, dok se kod biljnog ekstrakta maksimum za vibraciju istih funkcionalnih skupina nalazi na 3407 cm^{-1} . Hidroksilne skupine najvjerojatnije potječu od alkoholâ i fenolnih spojeva. U spektru biljnog ekstrakta maksimum pri 2937 cm^{-1} odgovara istežanju C–H. Istežanje –CN skupina prepoznaje se u oba spektra: apsorpcijski maksimum oko 1050 cm^{-1} kod cinkova oksida, a 1035 cm^{-1} kod biljnog ekstrakta. “Vrpce” u spektru cinkova oksida pri 1640 cm^{-1} i 1560 cm^{-1} odnose se na savijanje H–O–H, dok je kod biljnog ekstrakta prisutna “vrpca” istog istežanja pri oko 1630 cm^{-1} . Sve navedeno potvrđuje prisutnost fitokemikalija u uzorku nanočestica cinkova oksida, poput terpenoida i fenolâ koji su pridonosili nastajanju i stabilizaciji samih čestica.²



Slika 4. FT-IR spektar nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom (*ZnO NPs*) i vodenog ekstrakta morske lavande (*L. pruinosa extract*).²

2.2.4.1.3. Fitokemijski probir

Analiza fitokemijskih spojeva u biljnom ekstraktu koji su utjecali na nastanak, stabilizaciju i oblaganje nanočestica cinkova oksida provedena je pomoću sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Identifikacija spojeva izvedena je na temelju uspoređivanja retencijskih vremena, odnosno spektara masa s onima iz GC-MS spektralnih baza podataka (WILEY 09 i NIST 11). Ustanovljena je prisutnost sedam različitih spojeva u biljnom ekstraktu, prikazanih tablicom 1. ²

Tablica 1. Fitokemijski spojevi utvrđeni u vodenom ekstraktu nadzemnih tkiva biljke morska lavanda (*Limonium pruinosum*). ²

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

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

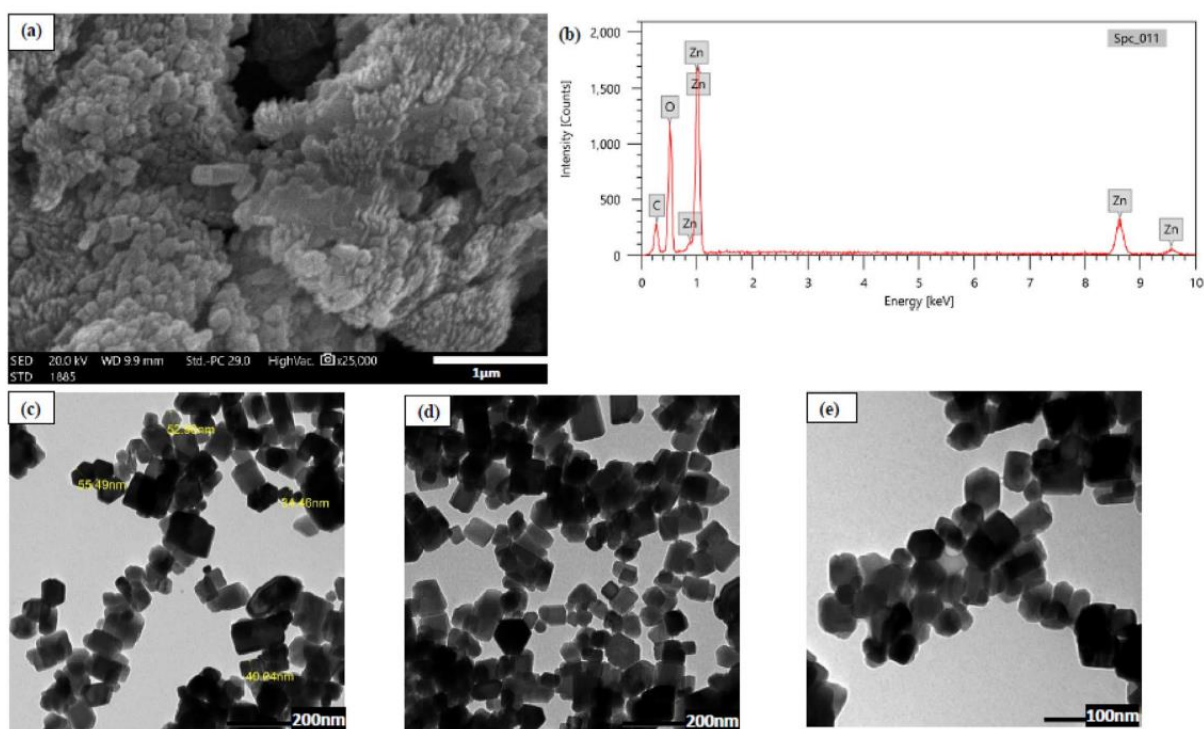
Temeljem podataka dobivenim UV-Vis, FT-IR i GC-MS analizama može se doći do zaključka da se vodeni ekstrakt morske lavande sastoji od više fitokemijskih spojeva koji uključuju alkohole, fenole, terpenoide i estere. Navedene supstancije najvjerojatnije pridonijele uspješnoj sintezi nanočestica cinkova oksida te su se ponašale kao stabilizirajuće i oblagajuće sredstvo. ²

2.2.4.1.4. Utvrđivanje morfologije i veličine čestica te njihovog elementnog sastava

S ciljem utvrđivanja veličine i oblika čestica te njihovih površinskih svojstava poslužili su pretražni elektronski mikroskop (eng. *scanning electron microscope* – SEM), energijski

razlučujuća rendgenska analiza (eng. *energy dispersive X-ray analysis* – EDX) i transmisijski elektronski mikroskop (eng. *transmission electron microscope* – TEM), a rezultati su prikazani na slici 5. SEM mikrografija (slika 5, a)) upućuje na izgled, tj. oblik čestica cinkova oksida kao i na njihovu površinsku morfologiju. EDX rezultati (slika 5, b)) potvrđuju elementni sastav dobivenog produkta te ukazuju na prisutnost organskih tvari čije izvorište je vodeni ekstrakt morske lavande. U prilog navedenom idu izraženi emisijski maksimumi pri ~ 1 keV, 8,6 keV i 9,6 keV koji potječu od cinka, maksimum pri $\sim 0,3$ keV odnosi se na ugljik, a maksimum pri $\sim 0,5$ keV na kisik.

Pomoću TEM mikrografija ustanovljena je heksagonalno prizmatična morfologija kristala cinkova oksida (slika 5, c), d), e)), s prosječnom veličinom čestica ~ 41 nm.²



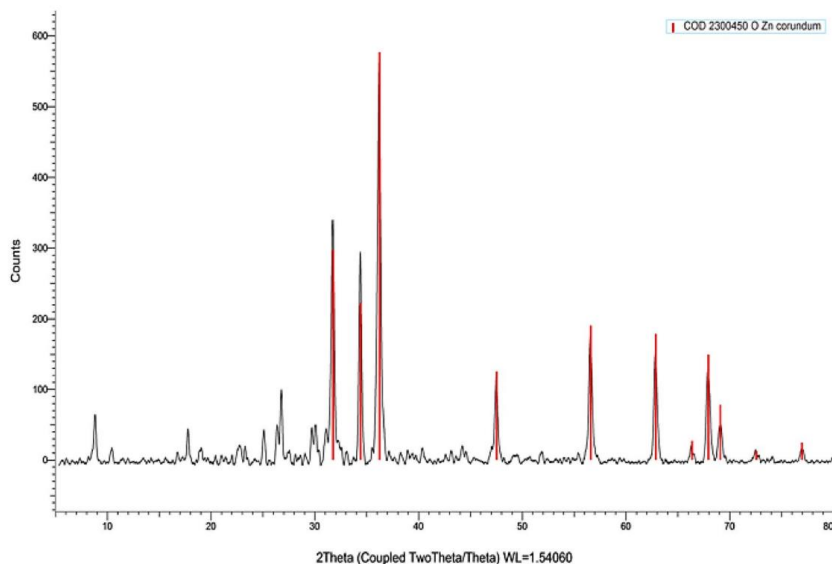
Slika 5. a) SEM mikrografija nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom, uvećanje 25 000 ×, b) EDX spektar, c) d) e) TEM mikrografije istih nanočestica.²

2.2.4.1.5. Difrakcija rendgenskog zračenja (XRD)

Nakon temeljitog sušenja provedena je rendgenska difrakcijska analiza polikristalnog uzorka nanočestica cinkova oksida uz $K\alpha$ zračenje ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), a relativni intenziteti snimani su u 2θ rasponu $5-100^\circ$. Na difraktogramu polikristalnog uzorka (slika 6) mogu se vidjeti oštri difrakcijski maksimumi na određenim stupnjevima (2θ) koji ukazuju na čistoću i kristaličnost

dobivenog produkta. Difrakcijski maksimumi pri 2θ stupnjevima $31,45^\circ$, $34,66^\circ$, $36,26^\circ$, $47,48^\circ$, $56,29^\circ$, $62,7^\circ$, i $68,31^\circ$ podudaraju se s onima objavljenim u drugim studijama koje su se bavile zelenom sintezom nanočestica cinkova oksida.^{2,45,46} Maksimumi su uspoređeni s podacima iz JCPDS Card baze difraktometrijskih podataka (eng. *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) čime je utvrđena heksagonska kristalna struktura uzorka te je određena prostorna grupa $P6_3mc$.²

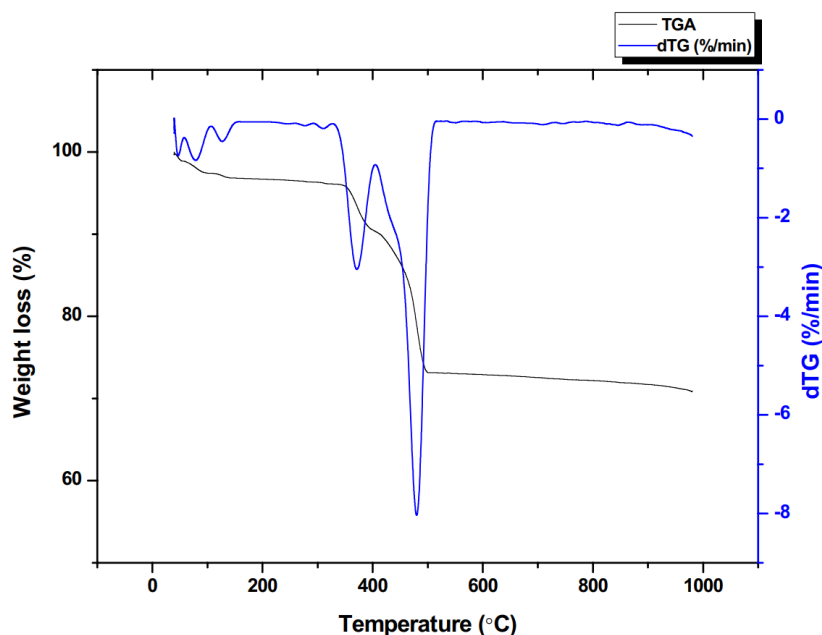
Služeći se Debye-Scherrerovom metodom ova je analiza također pokazala da prosječna veličina čestica iznosi približno 11 nm. Razlika navedene vrijednosti s rezultatom dobivenim putem TEM-a (41 nm) najvjerojatnije leži u činjenici da se XRD analizom mjeri veličina zrna, pri čemu velika zrna u uzorku mogu biti polikristalna, nastala koalescencijom iz manjih.^{2,47}



Slika 6. Difraktogram polikristalnog uzorka nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom.²

2.2.4.1.6. Termogravimetrija

Toplinska stabilnost nanočestica cinkova oksida dobivenog zelenom sintezom ispitana je termogravimetrijski. Bilježen je pad mase uzorka nanočestica prilikom zagrijavanja u temperaturnom rasponu od sobne temperature do 1000°C , u atmosferi dušika, s brzinom zagrijavanja $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Analizom je utvrđen stupnjeviti gubitak mase za ukupno 29,08 % polazne mase uzorka u navedenom temperaturnom rasponu, što je vidljivo na TGA krivulji termograma (slika 7). Prvi pad mase zapaža se do temperature $\sim 150^\circ\text{C}$ koji se može pripisati gubitku vode/vlage. Slijedi veći pad mase u rasponu od $\sim 350^\circ\text{C}$ do $\sim 500^\circ\text{C}$ najvjerojatnije na temelju toplinske razgradnje organskog sloja nanočestica.²

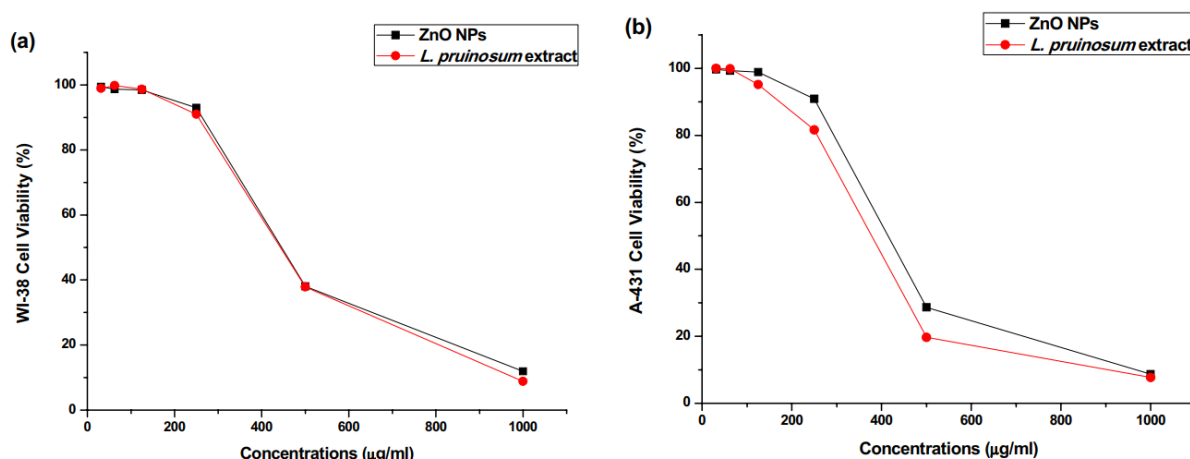


Slika 7. TGA i DTG krivulje uzorka nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom. ²

2.2.4.2. Utvrđivanje citotoksičnosti / antitumorskog djelovanja

Testom MTT ustanovljena je antitumorska aktivnost nanočestica cinkova oksida. Zabilježen je pad vijabilnosti tumorskih stanica kože (A-431) na 28,6 % u okruženju nanočestica cinkova oksida koncentracije $500 \mu\text{g cm}^{-3}$, nakon 24-satne izloženosti. Antitumorsko djelovanje nanočestica cinkova oksida ovisno je o njihovoj koncentraciji, što je prikazano na slici 8. Više koncentracije nanočestica (koncentracijski niz prikazan je na str. 13, potpoglavlje 2.2.3.5.) pored antitumorskog djelovanja uzrokovale su skupljanje stanica te njihovo odvajanje od podloge. Koncentracija nanočestica dovoljna da izazove 50 %-tnu inhibiciju rasta tumorskih stanica – IC_{50} , iznosi $409,7 \mu\text{g cm}^{-3}$, dok je za isti učinak kod zdravih stanica plućnog fibroblasta (WI-38) potrebno $568,59 \mu\text{g cm}^{-3}$. Navedeno ukazuje na veću toksičnost čestica prema tumorskim stanicama, odnosno veću biokompatibilnost prema zdravim stanicama. ²

Ovim testom također je istražena i antitumorska aktivnost vodenog ekstrakta morske lavande. IC_{50} vrijednost za ekstrakt kod zdravih stanica iznosi $554,17 \mu\text{g cm}^{-3}$, a kod tumorskih $362,74 \mu\text{g cm}^{-3}$. Rezultati ukazuju na veći antitumorski potencijal ekstrakta u odnosu na nanočestice što se može pripisati bogatijem fitokemijskom sastavu ekstrakta, u prvom planu heksadekanske kiseline, za koje je poznato da usporavaju, odnosno zaustavljaju rast tumorskih stanica. ²



Slika 8. Prikaz ovisnosti stanične vijabilnosti (%) o koncentraciji nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom (*ZnO NPs*) i vodenog ekstrakta morske lavande (*L. pruinosa* extract); a) normalne stanice plućnog fibroblasta (WI-38), b) tumorske stanice (A-431).²

2.2.4.3. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti

Istraživanje antimikrobne aktivnosti nanočestica cinkova oksida, vodenog ekstrakta morske lavande i antibiotika gentamicina kao pozitivne kontrole provedeno je kod šest patogenih mikroorganizama (navedenih na str. 13, potpoglavlje 2.2.3.6.). Kako nanočestice, tako i vodeni ekstrakt morske lavande pokazali su izraženo antimikrobno djelovanje, a kod pet mikroorganizama i veće od samog antibiotika. Prema izmjerenim zonama inhibicije najveći se učinak i nanočestica i biljnog ekstrakta očitovao kod bakterije *E. coli* i gljivice *C. albicans* (rezultati su predočeni u tablici 2).²

Tablica 2. Promjeri zonâ inhibicije mikrobnog rasta (mm) uz vodeni ekstrakt morske lavande (biljni ekstrakt), nanočestice cinkova oksida dobivene zelenom sintezom (ZnO) i gentamicin.²

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

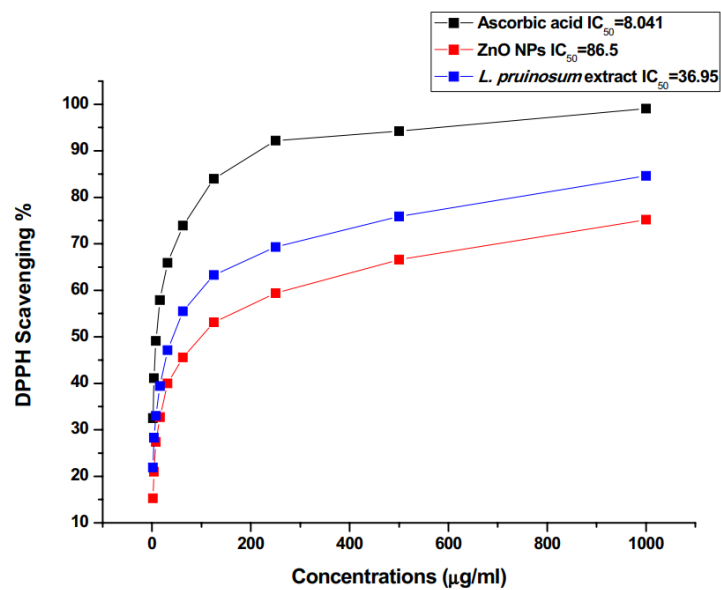
Brojni su razlozi koji pridonose antimikrobnim svojstvima fitokemikalija, a posebice onih u halofita, u koje spada morska lavanda. U literaturi je zabilježeno da ova skupina biljaka ima visoki sadržaj fenolâ koji se, zahvaljujući brojnim hidroksilnim skupinama, kao i lipofilnim svojstvima, mogu lako vezati za bakterijsku membranu. Slijedi nakupljanje fenolâ u lipidnom sloju membrane te njihov ulazak u stanicu gdje mogu sustavno uzurpirati čitavi rad stanice i narušiti joj integritet. Ulaskom u stanicu fenoli imaju inhibicijski utjecaj na enzime, sintezu DNA, proizvodnju adenozin-trifosfata (ATP), promjenu unutarstanične pH vrijednosti u konačnici uzrokujući lizu stanice.⁴⁸

Vrlo su slični i mehanizmi antibakterijskog djelovanja nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom. Iako su biokompatibilne sa zdravim humanim stanicama, ove čestice lako interagiraju s bakterijskom membranom uzrokujući stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Iste su u stanju peroksidirati membranske lipide dovodeći do stanične lize, odnosno narušavanja staničnog integriteta.^{2,49}

2.2.4.4. Utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti

DPPH metodom utvrđena je antioksidacijska aktivnost nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom, vodenog ekstrakta morske lavande i askorbinske kiseline kao kontrole. Rezultati (slika 9) su predstavljeni kao ovisnost postotka redukcije DPPH radikala (odn. RSC) o koncentraciji ispitivanih tvari. Otkrivena su značajna antioksidacijska svojstva nanočestica cinkova oksida – najveći postotak redukcije, 75,2 % postignut je pri koncentraciji 1000 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Vodeni ekstrakt pokazao je veće antioksidacijsko djelovanje pri istoj koncentraciji i njegov postotak redukcije iznosi 84,6 %.²

Konačni rezultati antioksidacijske aktivnosti, odnosno potencijala bilježe se pomoću IC_{50} vrijednosti (koncentracije uzoraka koje postižu 50 %-tni učinak redukcije). Ona za nanočestice cinkova oksida, dobivenih pomoću ekstrakta morske lavande, iznosi 86,5 $\mu\text{g cm}^{-3}$ dok je u literaturi zabilježen IC_{50} za iste nanočestice, dobivene pomoću druge biljke, u iznosu 95,80 $\mu\text{g cm}^{-3}$.⁵⁰ Antioksidacijski potencijal nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom treba pripisati prisutnosti fitokemikalija, budući da su djelovale kao sredstvo oblaganja nanočestica. Kako obloga kod nanočestica dobivenih pomoću morske lavande potječe od halofitne biljke, za koje je ustanovljeno veće antioksidacijsko djelovanje zbog prisutnosti fenolâ i činjenice da su se evolucijski adaptirale na ekstremne ekološke uvjete (visoki stres uzrokovan prekomjernom soli), tako i same nanočestice nose razmjerno veća antioksidacijska svojstva.²



Slika 9. Antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta morske lavande, nanočestica cinkova oksida dobivenih zelenom sintezom i askorbinske kiseline.²

3. Zaključak

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

4. Literaturni izvori

1. A. M. Negrescu, M. S. Killian, S. N. V. Raghu, P. Schmuki, A. Mazare, A. Cimpean, Metal Oxide Nanoparticles: Review of Synthesis, Characterization and Biological Effects, *J. Funct. Biomater.* **13** (2022) 274. doi: 10.3390/jfb13040274.
2. B. Naiel, M. Fawzy, M. W. A. Halmy, A. E. D. Mahmoud, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Sea Lavender (*Limonium pruinatum* L. Chaz.) extract: characterization, evaluation of anti-skin cancer, antimicrobial and antioxidant potentials, *Sci. Rep.* **12** (2022) 1–12. doi: 10.1038/s41598-022-24805-2.
3. M. De Liedekerke, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2.3. Zinc Oxide (Zinc White): Pigments, Inorganic, I*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2006. doi: 10.1002/14356007.a20_243.pub2.
4. A. Kołodziejczak-Radzimska, T. Jesionowski, Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review, *Materials* **7** (2014) 2833–2881. doi: 10.3390/ma7042833.
5. H. Mirzaei, M. Darroudi, Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications, *Ceram. Int.* **43** (2017) 907–914. doi: 10.1016/j.ceramint.2016.10.051.
6. W. H. Hunt, Nanomaterials: Nomenclature, novelty, and necessity, *JOM* **56** (2004) 13–18. doi: 10.1007/s11837-004-0281-5.
7. *Nanotehnologija, Hrvatska enciklopedija*, 2005, sv. 7, str. 577–578. URL: <https://tehnika.lzmk.hr/nanotehnologija/> (datum pristupa: 16. ožujka 2024.).
8. R. P. Feynman, There's Plenty of Room at the Bottom, *Engineering and Science* **23** (1960) 22–36. URL: www.zyvex.com/nanotech/feynman.html (datum pristupa: 16. ožujka 2024.).
9. N. Taniguchi, On the Basic Concept of NanoTechnology, *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng.* Tokyo (1974) 18–23.
10. T. Maxwell, M. G. Nogueira Campos, S. Smith, M. Doomra, Z. Thwin, S. Santra, *Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier, 2020, pogl. 15, str. 243–265. doi: 10.1016/B978-0-12-816662-8.00015-1.
11. Q. Liu, Q. Cui, X. J. Li, L. Jin, The applications of buckminsterfullerene C60 and derivatives in orthopaedic research, *Connect Tissue Res.* **55** (2014) 71–79. doi: 10.3109/03008207.2013.877894.
12. J. Chen et al., A Brief Introduction of Carbon Nanotubes: History, Synthesis, and Properties, *J. Phys.: Conf. Ser.* **1948** (2021) 1–9. doi: 10.1088/1742-6596/1948/1/012184.

13. A. K. Geim, Graphene prehistory, *Phys. Scr.* **2012** (2012) 1–4. doi: 10.1088/0031-8949/2012/T146/014003.
14. Ib. Khan, K. Saeed, Id. Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arab. J. Chem.*, **12** (2019) 908–931. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
15. R. J. Varghese, N. Zikalala, El H. M. Sakho, O. S. Oluwafemi, *Metal Oxides, Colloidal Metal Oxide Nanoparticles*, Elsevier, 2020, pogl. 5, str. 67–82. doi: 10.1016/B978-0-12-813357-6.00006-1.
16. N. Joudeh, D. Linke, Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists, *J. Nanobiotechnology* **20** (2022) 1–29. doi: 10.1186/s12951-022-01477-8.
17. S. Thomas, P. Kumar Mishra, S. Talegaonkar, Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery, *Curr. Pharm. Des.* **21** (2015) 6165–6188. doi: 10.2174/1381612821666151027153246.
18. A. I. Moreno-Vega, T. Gomez-Quintero, R. E. Nunez-Anita, L. S. Acosta-Torres, V. Castaño, Polymeric and ceramic nanoparticles in biomedical applications, *J. Nanotechnol.* **2012** (2012) 1–10. doi: 10.1155/2012/936041.
19. Z. U. R. Farooqi, A. Qadeer, M. M. Hussain, N. Zeeshan, P. Ilic, *Nanomaterials: Synthesis, Characterization, Hazards and Safety*, Elsevier, Rahim Yar Khan, 2021, str. 97–121.
20. M. Parashar, V. K. Shukla, R. Singh, Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications, *J. of Mater. Sci.: Mater. Electron.* **31** (2020) 3729–3749. doi: 10.1007/s10854-020-02994-8.
21. E. R. Balasooriya, C. D. Jayasinghe, U. A. Jayawardena, R. W. D. Ruwanthika, R. Mendis de Silva, P. V. Udagama, Honey Mediated Green Synthesis of Nanoparticles: New Era of Safe Nanotechnology, *J. Nanomater.* **2017** (2017) 1–10. doi: 10.1155/2017/5919836.
22. H. Sharma, K. Kumar, C. Choudhary, P. K. Mishra, B. Vaidya, Development and characterization of metal oxide nanoparticles for the delivery of anticancer drug, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **44** (2016) 672–679. doi: 10.3109/21691401.2014.978980.
23. Z. X. Tang, B. F. Lv, MgO nanoparticles as antibacterial agent: Preparation and activity, *Braz. J. Chem. Eng.* **31** (2014) 591–601. doi: 10.1590/0104-6632.20140313s00002813.
24. R. I. Walton, Subcritical solvothermal synthesis of condensed inorganic materials, *Chem. Soc. Rev.* **31** (2002) 230–238. doi: 10.1039/b105762f.

25. J. Liu, Z. Sun, Y. Deng, Y. Zou, C. Li, X. Guo, L. Xiong, Y. Gao, F. Li, D. Zhao, Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (2009) 5875–5879. doi: 10.1002/anie.200901566.
26. D. Bokov, A. T. Jalil, S. Chupradit, W. Suksatan, M. J. Ansari, I. H. Shewael, G. H. Valiev, E. Kianfar, Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application, *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2021** (2021) 1–21. doi: 10.1155/2021/5102014.
27. J. N. Hasnidawani, H. N. Azlina, H. Norita, N. N. Bonnia, S. Ratim, E. S. Ali, Synthesis of ZnO Nanostructures Using Sol-Gel Method, *Procedia Chem.* **19** (2016) 211–216. doi: 10.1016/j.proche.2016.03.095.
28. P. K. Mishra, H. Mishra, A. Ekielski, S. Talegaonkar, B. Vaidya, Zinc oxide nanoparticles: A promising nanomaterial for biomedical applications, *Drug Discov. Today* **22** (2017) 1825–1834. doi: 10.1016/j.drudis.2017.08.006.
29. Z. Wang, H. Zhang, L. Zhang, J. Yuan, S. Yan, C. Wang, Low-temperature synthesis of ZnO nanoparticles by solid-state pyrolytic reaction, *Nanotechnology* **14** (2003) 11–15. doi: 10.1088/0957-4484/14/1/303.
30. A. V. Nikam, B. L. V. Prasad, A. A. Kulkarni, Wet chemical synthesis of metal oxide nanoparticles: A review, *Cryst. Eng. Comm.* **20** (2018) 5091–5107. doi: 10.1039/C8CE00487K.
31. K. N. Ganesh, D. Zhang, S. J. Miller, K. Rossen, P. J. Chirik, M. C. Kozlowski, J. B. Zimmerman, B. W. Brooks, P. E. Savage, D. T. Allen, A. M. Voutchkova-Kostal, Green Chemistry: A Framework for a Sustainable Future, *Org. Process Res. Dev.* **25** (2021) 1455–1459. doi: 10.1021/acs.oprd.1c00216.
32. P. B. Chouke, T. Shrirame, A. K. Potbhare, A. Mondal, A. R. Chaudhary, S. Mondal, S. R. Thakare, E. Nepovimova, M. Valis, K. Kuca, et al., Bioinspired metal/metal oxide nanoparticles: A road map to potential applications, *Mater. Today Adv.* **16** (2022) 1–27. doi: 10.1016/j.mtadv.2022.100314.
33. R. Javed, M. Zia, S. Naz, S. O. Aisida, N. ul Ain, Q. Ao, Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects, *J. Nanobiotechnol* **18** (2020) 1–15. doi: 10.1186/s12951-020-00704-4.

34. C. Shen, S. A. James, M. D. de Jonge, T. W. Turney, P. F. A. Wright, B. N. Feltis, Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells, *Toxicol. Sci.* **136** (2013) 120–130. doi: 10.1093/toxsci/kft187.
35. S. A. M. K. Ansari, E. Ficiarà, F. A. Ruffinatti, I. Stura, M. Argenziano, O. Abollino, R. Cavalli, C. Guiot, F. D’Agata, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System, *Materials (Basel)* **12** (2019) 465. doi: 10.3390/ma12030465.
36. M. Ramesh, M. Anbuvaran, G. Viruthagiri, Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **136** (2015) 864–870. doi: 10.1016/j.saa.2014.09.105.
37. L. Fu, Z. Fu, *Plectranthus amboinicus* leaf extract–assisted biosynthesis of ZnO nanoparticles and their photocatalytic activity, *Ceram. Int.* **41** (2015) 2492–2496. doi: 10.1016/j.ceramint.2014.10.069.
38. D. Suresh, P. C. Nethravathi, Udayabhanu, H. Rajanaika, H. Nagabhushana, S. C. Sharma, Green synthesis of multifunctional zinc oxide (ZnO) nanoparticles using *Cassia fistula* plant extract and their photodegradative, antioxidant and antibacterial activities, *Mater. Sci. Semicond. Process.* **31** (2015) 446–454. doi: 10.1016/j.mssp.2014.12.023.
39. M. Sundrarajan, S. Ambika, K. Bharathi, Plant-extract mediated synthesis of ZnO nanoparticles using *Pongamia pinnata* and their activity against pathogenic bacteria, *Adv. Powder Technol.* **26** (2015) 1294–1299. doi: 10.1016/j.appt.2015.07.001.
40. K. Buch, T. Peters, T. Nawroth, M. Sängler, H. Schmidberger, P. Langguth, Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay—a comparative study, *Radiat. Oncol.* **7** (2012) 1–6. doi: 10.1186/1748-717X-7-1.
41. M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2021) 1–30. doi: 10.3390/ijms222312827.
42. F. D. Gonelimali, J. Lin, W. Miao, J. Xuan, F. Charles, M. Chen, S. R. Hatab, Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms, *Front. Microbiol.* **9** (2018) 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01639.
43. W. Brand-Williams, M. Cuvelier, C. Berset, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm. Wiss. Technol* **28** (1995) 25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

44. G. Singh, P. K. Babel, A. Kumar, A. Srivastava, R. P. Sinha, M. B. Tyagi, Synthesis of ZnO nanoparticles using the cell extract of the cyanobacterium, *Anabaena* strain L31 and its conjugation with UV-B absorbing compound shinorine, *J. Photochem. Photobiol. B.* **138** (2014) 55–62. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.030.
45. A. Aldalbahi, S. Alterary, R. Ali Abdullrahman Almoghim, M. A. Awad, N. S. Aldosari, S. Fahad Alghannam, A. Nasser Alabdan, S. Alharbi, B. Ali Mohammed Alateeq, A. Abdulrahman Al Mohsen, et al., Greener Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles: Characterization and Multifaceted Applications, *Molecules* **25** (2020) 1–14. doi: 10.3390/molecules25184198.
46. A. A. Barzinjy, H. H. Azeez, Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Eucalyptus globulus* Labill. leaf extract and zinc nitrate hexahydrate salt, *SN Appl. Sci.* **991** (2020) 1–14. doi: 10.1007/s42452-020-2813-1.
47. Y. Pu, Y. Niu, Y. Wang, S. Liu, B. Zhang, Statistical morphological identification of low-dimensional nanomaterials by using TEM, *Particuology* **61** (2022), 11–17. doi: 10.1016/j.partic.2021.03.013.
48. M. Lopes, A. Sanches-Silva, M. Castilho, C. Cavaleiro, F. Ramos, Halophytes as source of bioactive phenolic compounds and their potential applications, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **63** (2023) 1078–1101. doi:10.1080/10408398.2021.1959295.
49. M. Ahmar Rauf, M. Oves, F. Ur Rehman, A. Rauf Khan, N. Husain, *Bougainvillea* flower extract mediated zinc oxide's nanomaterials for antimicrobial and anticancer activity, *Biomed. Pharmacother.* **116** (2019) 1–12. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108983.
50. S. Loganathan, M. S. Shivakumar, S. Karthi, S. S. Nathan, K. Selvam, Metal oxide nanoparticle synthesis (ZnO-NPs) of *Knoxia sumatrensis* (Retz.) DC. Aqueous leaf extract and Its evaluation of their antioxidant, anti-proliferative and larvicidal activities, *Toxicol. Rep.* **8** (2020) 64–72. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.12.018.