

Uticaj stabilizatora na fizičko-hemijska svojstva nanočestica selena dobijenih hemijskom redukcijom

NENAD R. FILIPOVIĆ, Institut tehničkih nauka SANU, Beograd

ZORAN S. STOJANOVIĆ, Institut tehničkih nauka SANU, Beograd

MAGDALENA M. STEVANOVIĆ, Institut tehničkih nauka SANU, Beograd

Originalni naučni rad

UDC: 66.017/.018

DOI:10.5937/tehnika2102137F

Nanočestice selena (SeNPs) su specifična forma ovog elementa koja je u poslednje vreme postala predmet brojnih istraživanja, pogotovo u oblasti biomedicine. Do sada je razvijeno više metoda sinteze SeNPs, među kojima se najčešće koriste one koje podrazumevaju redukciju iz njegovih jedinjenja. U ovom radu ispitan je uticaj dva stabilizatora na morfologiju, veličinu i kristalno uređenje SeNPs dobijenih redukcijom natrijum selenita askorbinskom kiselinom. Kao stabilizatori SeNPs korišćeni su goveđi serum albumin (BSA) ili poliglutaminska kiselina (PGA). Na osnovu rezultata dobijenih metodama skenirajuće elektronske mikroskopije (FESEM), transmisiona elektronske mikroskopije (TEM), energetske disperzione spektroskopije (EDS), elektronske difrakcije sa selektovane površine (SAED) i merenjem zeta potencijala, utvrđeno je da mehanizam stabilizacije tj. izbor stabilizatora može prouzrokovati različito kristalno uređenje unutar SeNPs. BSA se pokazao kao efikasniji stabilizator jer omogućuje dobijanje uniformnijih, manjih i amorfnih nanočestica selena.

Ključne reči: nanočestice selena, nanotehnologija, sinteza nanočestica, karakterizacija nanočestica

1. UVOD

Iako je selen otkriven još davne 1817. godine od strane Jonsa Jakoba Berzelijusa, njegova primena se i danas istražuje u raznovrsnim naučnim disciplinama. Kako je u periodnom sistemu ispod sumpora, nalik njemu, može postojati u više alotropskih modifikacija [1] i to su:

- sivo/crna heksagonalna forma (u literaturi se često naziva trigonalna i termodinamički je najstabilnija);
- crvene monoklinične forme (α i β) koje su izgrađene od osmočlanih prstenova selenovih atoma;
- crna staklasta forma, koja sadrži velike prstenove od preko 1000 atoma selena; i
- crvena, amorfna forma, za koju se veruje da se pretežno sastoji iz kombinacije malih prstenova i deformisanih lanaca heksagonalnih oblika.

Pored brojnih industrijskih primena, Se je prepoznat kao mikroelement od esencijalne važnosti za pravilno funkcionisanje ljudskog organizma i ima jako bi-

o i fiziologiji ljudi [2]. Poznat je po tome što ulazi u sastav glutation peroksidaze i tioredoksin reduktaze (enzima koji imaju važnu ulogu u oksidativnim procesima i reakcijama detoksikacije), kao i aminokiseline seleno-cisteina, koja je konstituent brojnih proteina [2]. Usled velike biološke aktivnosti, poremećaj metabolizma Se je povezivan sa brojnim oboljenjima pa se koristi u terapijske svrhe protiv istih [3–7]. Osim antioksidativnog, velika pažnja naučne zajednice je usmerena u ispitivanju antikancerogenog efekta Se [8–10]. Međutim, i pored brojnih dokumentovanih radova, biomedicinska primena selena je značajno ograničena uskim intervalom koncentracija u kojem se on može bezbedno koristiti, pogotovo u dužim vremenskim intervalima [11]. Jedno od potencijalnih rešenja, koje se u poslednje vreme intenzivno istražuje, su nanočestice Se (SeNPs). Ova forma Se se pokazala kao dosta efikasnija od ostalih u pogledu raznih bioloških aktivnosti [12–14]. Do sada je u literaturi prijavljeno mnogo metoda za sintezu nanočestica selena od čega je većina sumirana u par preglednih radova [15–18].

Generalno se sve metode mogu podeliti u tri grupe: (i) metode hemijske sinteze (hemijska redukcija), (ii) metode fizičke sinteze (laserska ablacija, mikrotalasno zračenje), (iii) metode biosinteze (redukcija uz pomoć bioloških organizama ili njihovih ekstrakta).

Adresa autora: Nenad Filipović, Institut tehničkih nauka SANU, Beograd, Kneza Mihaila 35

e-mail: nenad.filipovic@itn.sanu.ac.rs

Rad primljen: 06.04.2021.

Rad prihvaćen: 09.04.2021.

Svaka od ovih metoda ima svoje prednosti i mane i u zavisnosti od izbora metode i odgovarajućih parametara, moguće je dobiti različite morfologije sa različitim unutrašnjim strukturama [19–22]. Što se tiče biomedicinske primene, uglavnom je od interesa amorfna ili crvena monoklinična forma, najčešće dobijena u vidu koloidnog rastvora. Prednosti koje nude metode hemijske sinteze (redukcije) su jednostavnost, ekonomičnost, reproducibilnost, dobar reakcioni prinos i mogućnost da se njihova površina funkcionalizuje raznim jedinjenjima koja im omogućavaju specifičnu primenu. Najčešće korišćena redukciona sredstva su askorbinska kiselina, glukoza, natrijum tiosulfat, glutatjon (redukovani oblik GSH) i brojna druga [15–17]. Upotreba stabilizatora u hemijskoj sintezi je često poželjna kako bi se dobile što uniformnije i stabilnije nanočestice. Prema literaturi, kao stabilizatori SeNPs najčešće se koriste razni polisaharidi (hitozan, karboksimetil celuloza, natrijum alginat), goveđi serum albumin (BSA), polivinil alkohol (PVA) itd. [13, 23–26]. Sa druge strane odgovarajućim izborom redukcionog sredstva moguće je čak izbeći dodatnu upotrebu stabilizatora [21, 27]. Međutim upotreba stabilizatora može znatno poboljšati biološku aktivnost, tj. efikasnost interakcije sa ćelijama. Tako na primer, upotreba BSA kao stabilizatora ne dovodi do pojačanog imunog odgovora organizma na prisustvo stranih čestica a omogućuje lak prolazak čestica kroz ćelijsku membranu bez rizika od povećane citotoksičnosti [13].

Razumevanje uticaja svih parametara sinteze SeNPs na brojna svojstva ove forme selena su od velikog značaja za njihovu širu primenu. U mnogim radovima je utvrđeno da svojstva poput morfologije, veličine i površinske hemije imaju ključnu ulogu na antikancerogeni [15–17] i antibakterijski efekat SeNPs [28–30]. Zbog toga je ideja ovog rada bila ispitivanje uticaja različitih stabilizatora na morfologiju, veličinu i kristalno uređenje nanočestica selena.

2. EKSPERIMENTALNI DEO

Sve hemikalije koje su korišćene u ovom radu su analitičke čistoće, a za potrebe pravljenja vodenih rastvora korišćena je destilovana voda.

2.1 Sinteza SeNPs

Sinteza SeNPs je urađena po ugledu na prethodnu studiju, uz malu modifikaciju [31]. Nanočestice selena su sintetisane hemijskom redukcijom natrijum selenita (Na_2SeO_3) uz upotrebu askorbinske kiseline (vitamin C, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) kao redukcionog sredstva.

Za stabilizaciju nanočestica selena korišćena su dva tipa stabilizatora, globularni protein (BSA) i linearni polimer – poliglutaminska kiselina (PGA). Najpre

su pripremljeni vodeni reakcioni rastvori prekursora Na_2SeO_3 i redukcionog sredstva $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ u koncentracijama 0,02M i 0,1M, tim redom. Potom su rastvori stabilizatora (masene koncentracije 0,16%) dodati u rastvor askorbinske kiseline, a kao finalni korak izvršeno je ukapavanje prekursora tj. Na_2SeO_3 . Odmah po dodavanju natrijum selenita, reakciona smeša iz bezbojne prelazi u žutu, a na kraju, po završetku ukapavanja, u cigla-crvenu boju kao znak formiranja SeNPs. Reakciona čaša u kojoj dolazi do redukcije Na_2SeO_3 je obmotana aluminijumskom folijom kako bi se sprečila interakciju nanočestica selena i vitamina C sa svetlom. Celokupna sinteza je vršena uz homogenizaciju na magnetenoj mešalici u ukupnom trajanju od 30 min pri brzini mešanja od 1000 rpm.

Za potrebe morfoloških ispitivanja skenirajućom elektronskom mikroskopijom (FE-SEM) dobijeni koloidni rastvori SeNPs su liofilizirani u liofilizatoru Alpha 1-4 LD (Martin Christ) pri pritisku od 0,36 mbar i u trajanju od 20 sati.

2.2 Karakterizacija SeNPs

Ispitivanje zeta potencijala je izvršeno na uređaju Zetasizer (Nano ZS, ZEN3600) koji radi na principu elektroforetičke mobilnosti, dok je rapodela veličine čestica (PSD) određena metodom laserske difrakcije na uređaju Mastersizer 2000, (Malvern Instruments Ltd, UK). U oba slučajeva uzorci su mereni direktno iz dobijenih koloidnih rastvora. Morfologija sintetisanih SeNPs ispitana je metodama elektronske mikroskopije. Liofilizirani uzorci SeNPs su pre snimanja na FESEM uređaju Supra 35 VP - Carl Zeiss naparavani ugljenikom. TEM mikrografije (JEOL JEM-2100) su napravljene sa dobijenim koloidnim rastvorima selena, napakavanjem na specijalizovanim bakarnim mrežicama. Energetska disperziona spektroskopija (EDS) je iskorišćena za kvantitativnu potvrdu selena, a ispitivanje kristalnog/amorfnog uređenja uzorka izvršeno je elektronskom difrakcijom sa selektovane površine (SA-ED).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Jedna od polaznih karakterizacija nanočestica dobijenih u formi koloidnog rastvora je ispitivanje zeta potencijala. Rezultati ispitivanja zeta potencijala prikazani su u tabeli 1. Pored zeta potencijala (ZP) prikazane su i vrednosti hidrodinamičkog radijusa i polidisperzionog indeksa (PDI). Ono što se odmah uočava je razlika u znaku površinskog naelektrisanja kao posledica stabilizacije različitim agensima. Negativni predznak kod čestica sintetisanih uz pomoć PGA potiče od činjenice da ovaj polimer u vodenom rastvoru ima anjonski karakter. Sa druge strane kod uzorka SeNPs-BSA zabeležena je pozitivna vrednost usled niskog pH (ispod izoelektrične tačke za ovaj

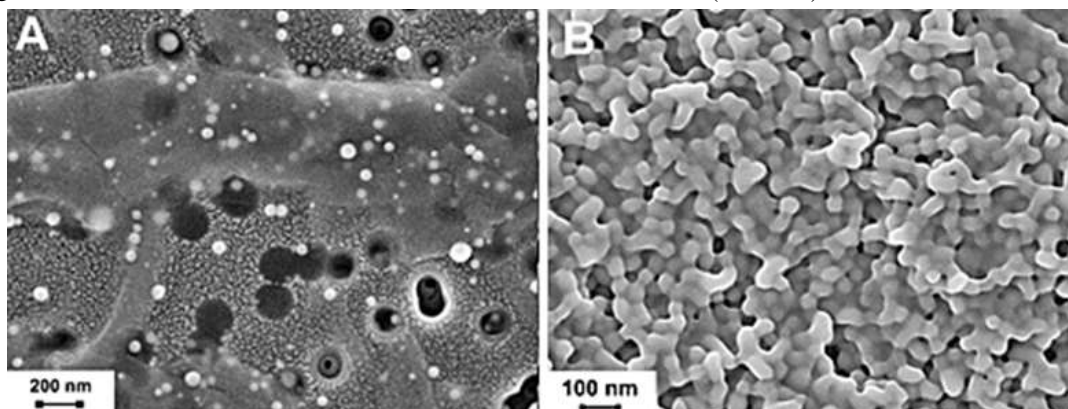
protein) koji potiče od askorbinske kiseline. Poređenjem apsolutnih vrednosti ZP može se doći do zaključka da je koloidni rastvor SeNPs-BSA stabilniji jer se smatra da su vrednosti ZP preko 25 mV dovoljne da obezbede stabilnost nanosuspenzija [32].

Što se tiče vrednosti hidrodinamičkog radijusa, potvrđeno je da su oba uzorka u nanočestičnoj formi (ispod 100 nm), i to uporedivih dijametara. Poređenjem vrednosti polidisperzionog indeksa (PdI), gde su dobijene vrednosti 0,118 i 0,133 za SeNPs-BSA i SeNPs-PGA respektivno, može se zaključiti da prvi sistem poseduju uniformniju raspodelu veličine čestica.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja zeta potencijala sintetisanih SeNPs

Uzorak	Hidrodin. radijus (nm)	PdI	ZP (mV)
SeNPs-PGA	96,5± (0,9)	0,133 ±0,009	-23,6 ±0,7
SeNPs-BSA	79,64 ±0,69	0,118 ±0,015	29,6 ±0,8

Dalja ispitivanja uniformnosti u pogledu raspodele veličine SeNPs su urađena metodom difrakcije laserske svetlosti i dobijeni rezultati su prikazani u na slici 1. Treba napomenuti da rezultat za uzorak SeNPs-PGA nije prikazan zbog tačnosti merenja, tj. nedovoljne pouzdanosti usled preklapanja intenziteta sa pozadinskim signalom [33].



Slika 1 - Raspodela veličina čestica kod uzorka SeNPs-BSA, određena metodom laserske difrakcije

Kao što se može videti sa slike 1, raspodela veličine čestica po zapremini je u skladu sa rezultatima dobijenim na uređaju za merenje ZP, iako ove tehnike koriste različite principe merenja. Dijametri čestica ovog uzorka se kreću u rasponu od 49 do 122 nm (d(0.1) i d(0.9)), pri čemu je 50% analiziranih čestica (d(0.5)) manje od 80 nm.

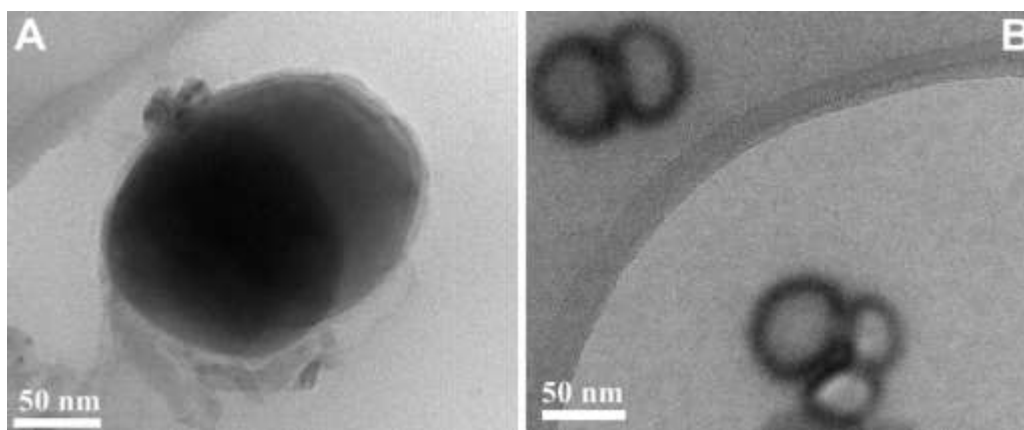
Detaljnija analiza morfologije, uniformnosti i veličine čestica u dobijenim uzorcima izvršena je metodom elektronske mikroskopije. Na slici 2 prikazane su FESEM mikrografije liofiliziranih uzoraka SeNPs i prvi zaključak je da su čestice svakako nanometarskih dimenzija. Kod uzorka SeNPs-PGA (slika 2A) uočava se pravilna sferna morfologija bez prisutne aglomeracije, što se ne može reći i za čestice u uzorku SeNPs-BSA (slika 2B).

Slika 2 - FESEM mikrografije sistema SeNPs-PGA (A) i sistema SeNPs-BSA (B)

Kod ovog uzorka aglomeracija je toliko izražena da se ne mogu naći izolovane čestice. Ipak, može se uočiti da su čestice sferne morfologije i to prilično uniformne u pogledu oblika i dimenzija. Liofilizacija nanosuspenzija je jedan od čistih pristupa sa ciljem da se dobiju uzorci u čvrstom stanju a da se u mnogome ne naruši njihova struktura [34]. Međutim, ovaj vid sušenja uzorka ponekad iziskuje upotrebu raznih protektanata, kako ne bi došlo do preterane aglomeracije i agregacije čestica unutar uzorka [34,35]. U našem prethodnom radu utvrdili smo da se PGA može koristiti i kao stabilizator i kao krioprotektant pri

dobijanju nanosfera poli (ϵ -kapolaktona) [36], a na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da istu funkciju može obaviti i prilikom sinteze SeNPs.

Dodatna ispitivanja morfoloških karakteristika čestica su urađena pomoću TEM mikroskopije (slika 3). Kao što smo napomenuli ranije, TEM analiza je izvršena nakapavanjem dobijenih koloidnih rastvora selena na odgovarajuće mrežice. Kod sistema SeNPs-PGA (slika 3A) prikazana je mikrografija dve izolovane čestice koje se preklapaju, pri čemu se može potvrditi njihova sferna morfologija i dimenzija ispod 100 nm.

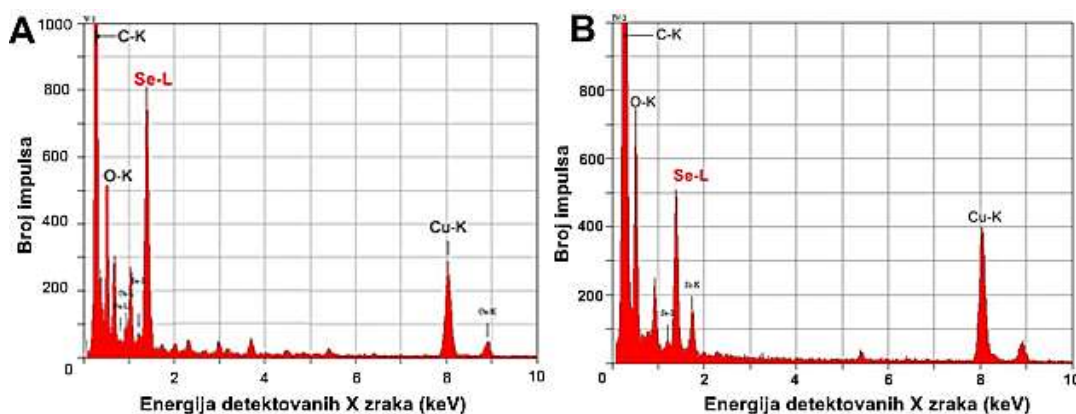


Slika 3 - TEM mikrografije sistema SeNPs-PGA (A) i sistema SeNPs-BSA (B)

Sa druge strane, kod sistema SeNPs-BSA (slika 3B) jasno se uočavaju dva skupa čestica čija je pojedinačna dimenzija ispod 50 nm a morfologija sferoidna. Usled njihovog slepljivanja u male aglomerate dolazi do formiranja prividnih struktura čije su dimenzije između 50 i 100 nm, a to je upravo ono što je i

detektovano merenjem zeta potencijala i difrakcijom laserske svetlosti.

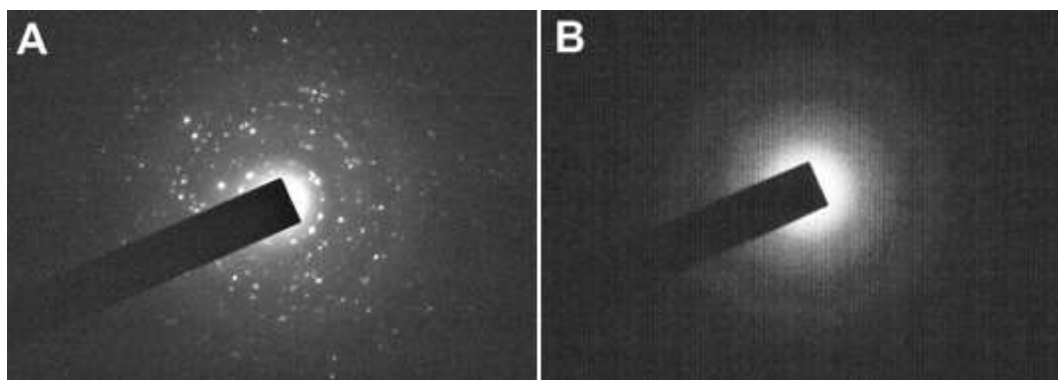
Jedna od glavnih prednosti elektronske mikroskopije je ta što se upadni elektronski snop može iskoristi za kvalitativnu analizu sastava EDS tehnikom i to na željenoj lokaciji.



Slika 4 - EDS spektri sistema SeNPs-PGA (A) i sistema SeNPs-BSA (B)

Na slici 4. prikazani su EDS spektri dobijeni sa površina prikazanih na slici 3. Kod oba spektra prisustvo Se je potvrđeno na osnovu emisije zračenja energije od 1.379 keV, koje potiče od elektrona iz L ljuske. Pored Se na spektrima su prisutni C, O i Cu.

Prva dva elementa ulaze u sastav oba stabilizatora dok detektovani Cu potiče sa bakarne mrežice. SAED analiza sintetisanih uzoraka je takođe izvršena na česticama prikazanim na slici 3, i dobijeni difrakcioni obrasci su prikazani na slici 5.



Slika 5 - Difrakcioni obrasci sistema SeNPs-PGA (A) i sistema SeNPs-BSA (B), dobijeni SAED tehnikom

Kao što se može videti postoji razlika između sistema SeNPs-PGA i SeNPs-BSA. U prvom slučaju može se uočiti da su difraktovani elektroni raspoređeni u vidu uskih koncentričnih linija (prstenova), što ukazuje na to da je uzorak polikristalan. Nasuprot ovome, kod sistema SeNPs-BSA, može se uočiti da su difraktovani elektroni difuzno i radijalno raspoređeni oko upadnog snopa, što ukazuje da je ovaj uzorak amorfan.

BSA se kao stabilizator nanočestica selena često koristio u istraživanjima publikovanim u prethodnom periodu [18, 19, 37–40]. Ono što je karakteristično za ovaj protein je što omogućuje dobijanje sfernih i amorfnih SeNPs. Sa druge strane, prema našem saznanju, do sada nije prijavljena upotreba PGA za stabilizaciju SeNPs. Na osnovu svih predstavljenih rezultata, može se zaključiti da je sam mehanizam stabilizacije nanočestica Se dosta različit u opisanim sistemima, te se umesto SeNPs sa amorfnim uređenjem dobijaju SeNPs kristalne strukture kada se kao stabilizator koristi PGA. Trigonalana forma SeNPs je termodinamički najstabilnija i prevođenje iz amorfne se može izvršiti prostim zagrevanjem koloidnog rastvora na temperaturi od 90 °C [41]. Pinto je sa svojim kolegama čak dokazao da je ova transformacija moguća i kao spontani process, na sobnoj temperaturi, posle određenog vremena [42]. Na kraju treba napomenuti da unutrašnja struktura SeNPs utiče na njihovu bioaktivnost i raspoloživost, i to u korist amorfne forme [41].

4. ZAKLJUČAK

Nanočestice selena predstavljaju novu formu ovog elementa koja se u odnosu na druge forme pokazala kao superiornija u pogledu biološke aktivnosti uz smanjenje toksičnog efekta. Kako bi njihov potencijal bio dovoljno iskorišćen, potrebno je ispitati uticaj raznih parametara sinteze koji mogu uticati na njihova svojstva. U ovom radu je demonstrirano da upotreba različitog tipa stabilizatora može dovesti do promene u kristalnoj strukturi SeNPs. U tom pogledu, BSA se pokazao kao efikasniji stabilizator čestica jer sprečava prelazak iz amorfne u kristalno uređenje. Takođe, utvrđeno je da su čestice stabilisane uz pomoć BSA, manjeg dijametara i uniformnije raspodele veličina. Dalja istraživanja su potrebna u cilju razjašnjenja mehanizma stabilizacije i prirode interakcije između Se i navedenih stabilizatora, kako bi se što bolje predvidela i objasnila njihova biološka aktivnost.

5. ZAHVALNICA

Ova istraživanja su finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije a na osnovu ugovora sa Institutom tehničkih nauka SANU (br. ugovora: 451-03-9/2021-14/200175).

Autori zahvaljuju dr Sreću Škapinu na pomoći pri karakterizaciji uzoraka metodama elektronske mikroskopije.

LITERATURA

- [1] T. Takahashi, Comparative x-ray-photoemission study of monoclinic, trigonal, and amorphous selenium, *Phys. Rev. B.* 26 (1982) 5963–5964, 1982.
- [2] M. P. Rayman, The importance of selenium to human health, *Lancet.* 356, 233–241, 2000.
- [3] M. G. Boosalis, The Role of Selenium in Chronic Disease, *Nutr. Clin. Pract.* 23, 152–160, 2008.
- [4] S. J. Fairweather-Tait, Y. Bao, M. R. Broadley, R. Collings, D. Ford, J. E. Hesketh, R. Hurst, Selenium in Human Health and Disease, *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1337–1383, 2011.
- [5] J. J. Cao, B. R. Gregoire, H. Zeng, Selenium Deficiency Decreases Antioxidative Capacity and Is Detrimental to Bone Microarchitecture in Mice, *J. Nutr.* 142, 1526–1531, 2012.
- [6] H. Zeng, J. J. Cao, G. F. Combs, Selenium in Bone Health: Roles in Antioxidant Protection and Cell Proliferation, *Nutrients.* 5, 97–110, 2013.
- [7] R. Moreno-Reyes, D. Egrise, J. Nève, J. L. Pasteels, A. Schoutens, Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia, *J. Bone Miner. Res.* 16, 1556–1563, 2001.
- [8] R. Sinha, K. El-Bayoumy, Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds, *Curr. Cancer Drug Targets.* 4, 13–28, 2004.
- [9] C. Ip, Lessons from basic research in selenium and cancer prevention., *J. Nutr.* 128, 1845–54, 1998.
- [10] M. P. Rayman, Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action, *Proc. Nutr. Soc.* 64, 527–542, 2005.
- [11] M. Vinceti, T. Filippini, S. Cilloni, A. Bargellini, A. V. Vergoni, A. Tsatsakis, M. Ferrante, Health risk assessment of environmental selenium: Emerging evidence and challenges, *Mol. Med. Rep.* 15, 3323–3335, 2017.
- [12] J. Zhang, X. Wang, T. T. Xu, Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with se-methylselenocysteine in mice, *Toxicol. Sci.* 101, 22–31, 2008.

- [13] J. S. Zhang, X. Y. Gao, L. D. Zhang, Y. P. Bao, Biological effects of a nano red elemental selenium, *Biofactors*. 15, 27–38, 2001.
- [14] H. Wang, J. Zhang, H. Yu, Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice, *Free Radic. Biol. Med.* 42. 1524–1533, 2007.
- [15] B. Sarkar, S. Bhattacharjee, A. Daware, P. Tribedi, K. K. Krishnani, P. S. Minhas, Selenium Nanoparticles for Stress-Resilient Fish and Livestock, *Nano-scale Res. Lett.* 10, 2015.
- [16] T. M. Sakr, M. Korany, K. V. Katti, Selenium nanomaterials in biomedicine - An overview of new opportunities in nanomedicine of selenium, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 46, 223–233, 2018.
- [17] S. Chhabria, K. Desai, *Selenium Nanoparticles and Their Applications*, *Encycl. Nanosci. Nanotechnol.* 1–32, 2016.
- [18] X. D. Shi, Y. Q. Tian, J. L. Wu, S. Y. Wang, Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–12, 2020.
- [19] S. V. Valueva, L. N. Borovikova, V. V. Koreneva, Y. I. Nazarkina, a. I. Kipper, V. V. Kopeikin, Structural-morphological and biological properties of selenium nanoparticles stabilized by bovine serum albumin, *Russ. J. Phys. Chem. A.* 81, 1170–1173, 2007.
- [20] H. Chen, J.-B. B. Yoo, Y. Liu, G. Zhao, Green synthesis and characterization of se nanoparticles and nanorods, *Electron. Mater. Lett.* 7, 333–336, 2011.
- [21] A. R. Ingole, S. R. Thakare, N. T. Khatri, A. V. Wankhade, D. K. Burghate, Green synthesis of selenium nanoparticles under ambient condition, *Chalcogenide Lett.* 7, 485–489, 2010.
- [22] X. Gao, J. Zhang, L. Zhang, Hollow sphere selenium nanoparticles: Their in-vitro anti hydroxyl radical effect, *Adv. Mater.* 14, 290–293, 2002.
- [23] L. Kong, Q. Yuan, H. Zhu, Y. Li, Q. Guo, Q. Wang, X. Bi, X. Gao, The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis, *Biomaterials*. 32, 6515–6522, 2011.
- [24] S. Y. Zhang, J. Zhang, H. Y. Wang, H. Y. Chen, Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides, *Mater. Lett.* 58, 2590–2594, 2004.
- [25] C. Shah, M. Kumar, P. Bajaj, Acid-induced synthesis of polyvinyl alcohol-stabilized selenium nanoparticles, *Nanotechnology*. 18, 385607, 2007.
- [26] Z. H. Lin, F. C. Lin, C. R. C. Wang, *Observation in the growth of selenium nanoparticles*, *J. Chinese Chem. Soc.* 51, 239–242, 2004.
- [27] Z. Chen, Y. Shen, A. Xie, J. Zhu, Z. Wu, F. Huang, *L-Cysteine-assisted controlled synthesis of selenium nanospheres and nanorods*, *Cryst. Growth Des.* 9. 1327–1333, 2009.
- [28] D. Chudobova, K. Cihalova, S. Dostalova, B. Ruttkay-Nedecky, M.A. Merlos Rodrigo, K. Tmejova, P. Kopel, L. Nejd, J. Kudr, J. Gumulec, S. Krizkova, J. Kynicky, R. Kizek, V. Adam, Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection, *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 195–201, 2014.
- [29] E. Cremonini, E. Zonaro, M. Donini, S. Lampis, M. Boaretti, S. Dusi, P. Melotti, M. M. Lleo, G. Vallini, Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts, *Microb. Biotechnol.* 9, 758–771, 2016.
- [30] N. Filipović, D. Ušjak, M.T. Milenković, K. Zheng, L. Liverani, A. R. Boccaccini, M. M. Stevanović, Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Selenium Nanoparticles With Different Surface Chemistry and Structure, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 2021.
- [31] N. Filipović, L. Veselinović, S. Ražić, S. Jeremić, M. Filipič, B. Žegura, S. Tomić, M. Čolić, M. Stevanović, Poly (ϵ -caprolactone) microspheres for prolonged release of selenium nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C.* 96, 776–789, 2019.
- [32] A. J. Shnoudeh, I. Hamad, R. W. Abdo, L. Qadumii, A. Y. Jaber, H. S. Surchi, S. Z. Alkelany, Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles, in: *Biomater. Bionanotechnol. Elsevier*, pp. 527–612, 2019.
- [33] Z. Stojanović, S. Marković, D. Uskoković, Merenje raspodele veličina čestica metodom difrakcije laserske svetlosti, *Teh. Mater.* 19, 1–15, 2010.
- [34] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1688–1713, 2006.
- [35] P. Fonte, S. Reis, B. Sarmento, Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery, *J. Control. Release.* 225, 75–86, 2016.
- [36] N. Filipović, M. Stevanović, J. Nunić, S. Cundrič, M. Filipič, D. Uskoković, *Synthesis of poly(ϵ -caprolactone) nanospheres in the presence of the*

- protective agent poly(glutamic acid) and their cytotoxicity, genotoxicity and ability to induce oxidative stress in HepG2 cells*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117, 414–424, 2014.
- [37] H. H. Lara, G. Guisbiers, J. Mendoza, L. C. Mimun, B. A. Vincent, J. L. Lopez-Ribot, K. L. Nash, *Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against Candida albicans biofilms*, *Int. J. Nanomedicine*. 13, 2697–2708, 2018.
- [38] N. Filipović, L. Veselinović, S. Ražić, S. Jeremić, M. Filipič, B. Žegura, S. Tomić, M. Čolić, M. Stevanović, *Poly (ε-caprolactone) microspheres for prolonged release of selenium nanoparticles*, *Mater. Sci. Eng. C*. 96, 2019.
- [39] W. Chen, Y. Li, S. Yang, L. Yue, Q. Jiang, W. Xia, *Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles*, *Carbohydr. Polym.* 132, 574–581, 2015.
- [40] S. Chung, R. Zhou, T. J. Webster, *Green synthesized BSA-coated selenium nanoparticles inhibit bacterial growth while promoting mammalian cell growth*, *Int. J. Nanomedicine* 15, 115–124, 2020.
- [41] J. Zhang, E.W. Taylor, X. Wan, D. Peng, *Impact of heat treatment on size, structure, and bioactivity of elemental selenium nanoparticles*, *Int. J. Nanomedicine*. 7, 815–825, 2012.
- [42] A. H. Pinto, E. R. Leite, E. Longo, E. R. De Camargo, *Crystallization at room temperature from amorphous to trigonal selenium as a byproduct of the synthesis of water dispersible zinc selenide*, *Mater. Lett.* 87, 62–65, 2012.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF STABILIZING AGENTS ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF SELENIUM NANOPARTICLES OBTAINED BY CHEMICAL REDUCTION

Selenium nanoparticles (SeNPs) are specific form of this element that has recently become the subject of numerous research, especially in the field of biomedicine. Several synthesis procedures for obtaining SeNPs have been developed so far, among those including reduction of selenium salts are the most frequently used. In this work, it is examined the effect of two stabilizing agents on morphology, size, and crystallinity of obtained SeNPs. For this purpose, bovine serum albumin (BSA) and polyglutamic acid (PGA) were used as stabilizing agents while reduction of sodium selenite with ascorbic acid was elected as a synthesis procedure. Based on the results obtained from scanning electron microscopy (FESEM), transmission electron microscopy (TEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), selected area electron diffraction (SAED), and measurements of zeta potential, it was determined that the mechanism of stabilization i.e. choice of stabilizing agent can promote different crystalline arrangement within SeNPs. The BSA proved as a more effective stabilizing agent for SeNPs, as it provides obtaining the smaller, more uniform, and amorphous nanoparticles.

Key words: *selenium nanoparticles, nanotechnology, synthesis of nanoparticles, characterization of nanoparticles*