

# Biogena sinteza nanočestica selena korištenjem ekstrakta komine masline

---

**Mandac, Roko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:773241>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Roko Mandac**

**Biogena sinteza nanočestica seleno korištenjem  
ekstrakta komine masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj diplomski rad je nastao kao rezultat istraživanja u sklopu projekta „Primjena nanobiotehnologije u suplementaciji hrane sa selenom (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost.

This Master thesis was done as a result of investigations under the project entitled „Application of Nanobiotechnology for Nutritional Supplementation with Selenium – (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financed by Croatian Science Foundation.

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu, trudu i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem i svim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane na pomoći i ugodnoj atmosferi za vrijeme odrađivanja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Hvala svim mojim dragim prijateljima, obitelji i djevojci na podršci tokom studija.*

*Veliko hvala mojoj sestri koja je tijekom cijelog mog školovanja bila tu uz mene.*

*Najveće hvala mojoj majci bez čije neprestane potpore i požrtvornosti ne bih bio tu gdje jesam.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Selen .....	1
1.1.1. Metabolizam i nedostatak selena u ljudskom organizmu .....	1
1.1.2. Nutritivni izvori i dodaci prehrani .....	3
1.1.3. Biološka uloga i toksičnost .....	4
1.2. Nanoselen .....	6
1.2.1. Biogena sinteza korištenjem biljnih ekstrakata i karakterizacija .....	7
1.2.2. Terapijska primjena .....	8
1.3. Maslina .....	10
1.3.1. Komina masline .....	11
1.3.2. Polifenoli komine masline .....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. Kemikalije i pribor .....	15
3.1.2. Instrumenti .....	15
3.2. Metode .....	16
3.2.1. Priprema suhog ekstrakta komine masline .....	16
3.2.2. Biogena sinteza nanočestica selena .....	16
3.2.3. Određivanje veličine nanočestica korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti ( <i>Dynamic Light Scattering, DLS</i> ) .....	18
3.2.4. Mjerenje zeta potencijala .....	20
3.2.5. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom .....	21
3.2.6. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom .....	24
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27

4.1. Veličina i stabilnost biogeno sintetiziranih nanočestica selena.....	27
4.2. Zeta potencijal biogeno sintetiziranih nanočestica selena.....	33
4.3. ABTS antioksidacijska aktivnost biogeno sintetiziranih nanočestica selena .....	34
4.4. Ukupni redukcijski potencijal biogeno sintetiziranih nanočestica selena .....	36
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40
7. SAŽETAK.....	47

# 1. UVOD

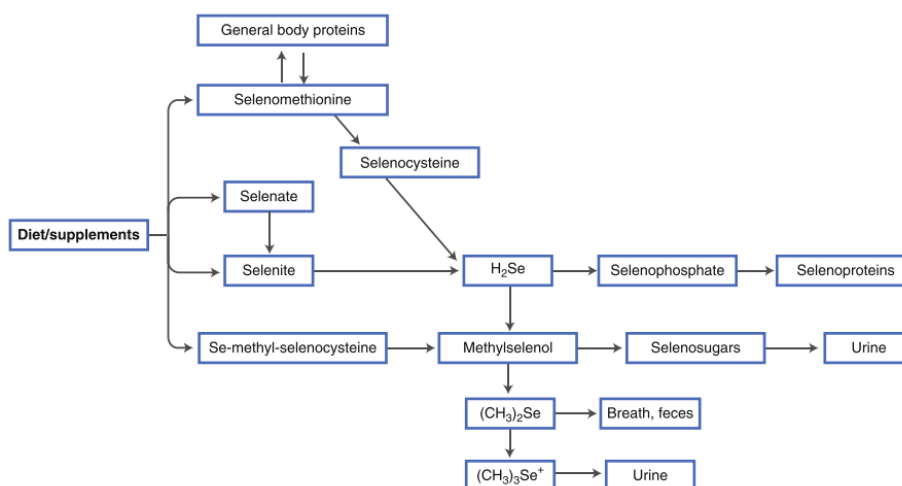
## 1.1. Selen

Selen je kemijski element u tragovima koji je prisutan i dostupan u brojnim namirnicama i dodacima prehrani te predstavlja esencijalni mikronutrijent za brojne stanične procese, s posebnim naglaskom na zaštitu od oksidacijskog stresa. U obliku selenocisteina, gradivna je i funkcionalna jedinica antioksidacijskih i drugih vrsta enzima koji se u literaturi iz tog razloga navode kao selenoproteini. U prirodi najčešće postoji u dva oblika: anorganskom, kao selenid, selenit i selenat, i organskom obliku, kao selenometionin, selenocistein te metilselenocistein, gdje u živim bićima ostvaruje ulogu analognu sumporu (Sunde, 2006). Elementarni selen vrlo je rijedak, a najčešće se pojavljuje uz elementarni sumpor u rudama. Biljke akumuliraju anorganski selen iz tla i pretvaraju ga u spomenute organske oblike u kojima se nalazi većina selena u ljudskom organizmu (Pilon-Smits i sur., 2009). Tla su obično siromašna selenom i kulture koje se uzgajaju na njima posljedično sadrže manje količine sintetiziranog organskog selena, koji se između ostalog najbolje apsorbira iz ljudskog probavnog trakta. Rezultat toga je široko rasprostranjen nutritivni deficit tog elementa, a procjenjuje se da je prisutan u oko 0.5 do 1 milijarde ljudi (Nothstein i sur., 2016). Iz tog se razloga danas sve više pribjegava obogaćivanju tla tj. usjeva anorganskim selenom kako bi se povećala nutritivna vrijednost hrane biljnog porijekla za ljudsku primjenu kao i kvaliteta stočne hrane (White i Broadley, 2009). Brojna istraživanja pokazala su izvrsne rezultate oplemenjivanja usjeva anorganskim selenom u smislu porasta sadržaja selen-metilselenocisteina u biljci. Npr. tretiranje sjemena biljne vrste *Brassica spp.* s 50  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  značajno je povećalo sintezu te antitumorske komponente (Ávila i sur., 2014). S druge strane, presudnu ulogu u prevenciji i liječenju nedostatka selena u organizmu ima i farmaceutska industrija razvijanjem novih formulacija dodataka prehrani čime se može poboljšati kvaliteta liječenja i ishod različitih patoloških stanja čija etiologija se povezuje s niskim razinama selena u organizmu.

### 1.1.1. Metabolizam i nedostatak selena u ljudskom organizmu

Selen se u normalnim fiziološkim uvjetima u gotovo svim oblicima apsorbira 70-90%, a iznimka su seleniti (<60%). Najčešće se u obliku selenometionina (SeMet), koji je i najzastupljeniji oblik selena u namirnicama, velikim afinitetom veže za  $\text{Na}^+$ -ovisni

aminokiselinski transportni sustav na površini intestinalnih stanica tankog crijeva što čini glavni put apsorpcije selena kod sisavaca (Vendeland i sur., 1994). U ljudskom organizmu najvećim se dijelom pohranjuje u proteinima skeletnih mišića (28-46%) gdje se SeMet nespecifično ugrađuje u aminokiselinski slijed proteina umjesto metionina (Erdman i sur., 2012). Kada se stvori metabolička potreba za tim (Slika 1), biokemijskom reakcijom iz bazena takvih nespecifično ugrađenih aminokiselina SeMet, procesom *trans*-selenacije nastaje selenocistein (SeCys), koji se zatim reducira do vodikovog selenida ( $H_2Se$ ), središnjeg spoja u metabolizmu selena. Do središnjeg selenida također se reduciraju i hranom uneseni selenati i seleniti. Vodikov selenid dalje se fosforilira u selenofosfat koji zatim ulazi u proces biosinteze selenoproteina, što je njegova ključna uloga (Davis, 2012). U eliminacijskom putu, metilacijom visokoreaktivnih selenida nastaju metaboliti koji se pretežno izlučuju urinom i plućima, a znanstveni dokazi upućuju da je upravo metilselenol spoj koji bi mogao biti ključan u prevenciji karcinoma. Iz toga proizlazi da su spojevi koji mogu biti direktno metilirani u metilselenol, puno efikasniji od selenita u prevenciji raka (Ip i sur., 1991).



**Slika 1.** Shematski prikaz metabolizma selena (Davis, 2012)

Deficit selena može uzrokovati brojna patološka stanja različitih organskih sustava: kardiovaskularnog, endokrinog, imunološkog, koštano-mišićnog, živčanog i reproduktivnog sustava (Yang i sur., 2017). Veću predispoziciju za razvoj takvih bolesti imaju osobe kod kojih je prisutan i sekundarni izvor koji uzrokuje povećani oksidacijski stres, npr. paralelna virusna infekcija ili bilo kakav drugi stres. Teški deficiti kod djece zabilježeni su 1970.-ih u nekim područjima Kine i istočnog Sibira gdje je tlo izrazito siromašno selenom, a doveli su do pojave tzv. Keshan bolesti. Karakteristike bolesti su kardiomiopatija, povećani miokard, abnormalni elektrokardiogram, kardiogeni šok i kongestivno zatajenje srca (Chen, 2012). Druga bolest koja

se povezuje s nedostatkom selena jest Kashin-Beck bolest. To je oblik osteoartritisa koji se obično javlja kod adolescenata, a manifestira se atrofijom, degeneracijom i naposljetku nekrozom hrskavice u zglobovima. Neki od patoloških znakova su bol i jutarnja ukočenost zglobova te njihovo povećanje i ograničena pokretljivost (Hartikainen, 2005). Pretpostavlja se da je većini bolesti uzrokovanih deficijencijom selena zajednički uzrok nedostatak i smanjena funkcija antioksidacijskih enzima kojima je selen kofaktor, prvenstveno glutathion peroksidaze (GPx) i tioredoksin reduktaze (TrxR). Zbog neminovno povećanog oksidacijskog stresa nastaju velika oštećenja uzrokovana nastalim reaktivnim vrstama različitog porijekla (Roman i sur., 2014). Nadalje, epidemiološka istraživanja pokazala su veću incidenciju nekoliko tipova karcinoma u ljudi sa smanjenim koncentracijama selena u plazmi i noktima: kolorektalnog karcinoma, karcinoma jetre, prostate, mokraćnog mjehura, jednjaka, želuca i pluća (naročito kod pušača) (Dennert i sur., 2012).

### **1.1.2. Nutritivni izvori i dodaci prehrani**

Kod zdravog odraslog čovjeka preporučena dnevna doza selena iznosi 55 µg, a kod žena u trudnoći i laktaciji raste na 60 odnosno 70 µg. Minimalna doza selena potrebna za prevenciju Keshanove bolesti iznosi barem 20 µg/dan (Institute of Medicine, 2000). Količina selena u hrani ovisi o koncentracijama u tlu na kojem su biljke rasle i životinje živjele, a određena je vrstom tla, agro-klimatskim uvjetima te geografskim položajem. Iako pokazuje pozitivna svojstva u biljnim organizmima, ponajprije potičući rast i razvoj same biljke, smanjujući lipidnu peroksidaciju u stanicama i poboljšavajući zaštitnu ulogu od ultraljubičastog zračenja (Hartikainen, 2005), selen nije esencijalni element za više biljke. Stoga nutritivne tablice koje pokazuju prosječan sadržaj selena treba uzeti s oprezom jer će npr. pšenica koja je rasla na tlu siromašnom selenom imati nizak sadržaj selena dok pšenica uzgojena na tlu koje je bogato selenom pokazuje puno veće razine. Općenito najbogatiji prirodni izvori selena su meso, riba, morski plodovi, žitarice, jaja i neki orašasti plodovi, posebice brazilski oraščić koji prirodno može sadržavati čak do 512 µg/g selena (Chang i sur., 1995). S obzirom da je sisavcima i brojnim drugim životinjama selen neophodni mikronutrijent, konzumacijom životinjskih proizvoda, koji prosječno sadrže više selena, osigurava se optimalan unos.

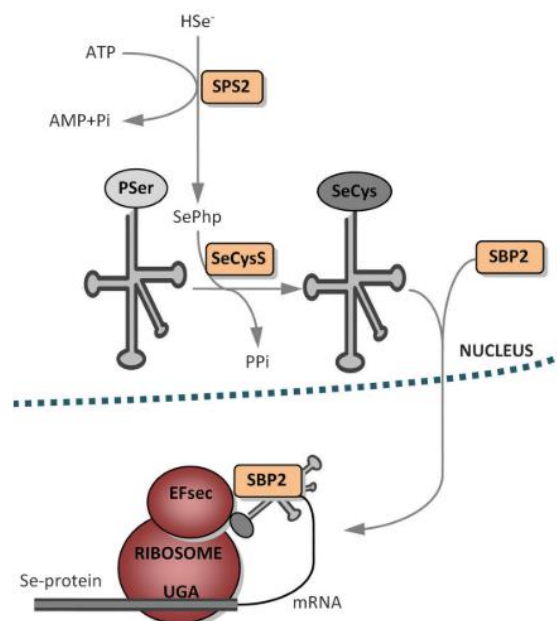
Kao dodatak prehrani selen se na tržištu može pronaći u sastavu multivitaminskih/multimineralnih pripravaka i kao samostalni pripravak. U samostalnim



pripravcima najčešće je zastupljen u obliku selenometionina u različitim koncentracijama (60-200  $\mu\text{g}$ ), potom kao selen-metilselenocistein (100-200  $\mu\text{g}$ ) te zaključno u anorganskim oblicima selenita/selenata (30-100  $\mu\text{g}$ ) (Rayman i sur, 2008). Multivitaminski dodaci prosječno sadrže puno manje koncentracije selena. Kao dodatak funkcionalnoj hrani, proizvode se kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae* uzgojeni u mediju bogatom selenom, gdje se selen ugrađuje u razne strukturne i funkcionalne proteine i peptide kvasca umjesto sumpora. Takav komercijalni obogaćeni kvasac prosječno sadrži 500-2000  $\mu\text{g/g}$  ukupnog selena, najviše u obliku selenometionina (70-90%) (Schrauzer, 2006).

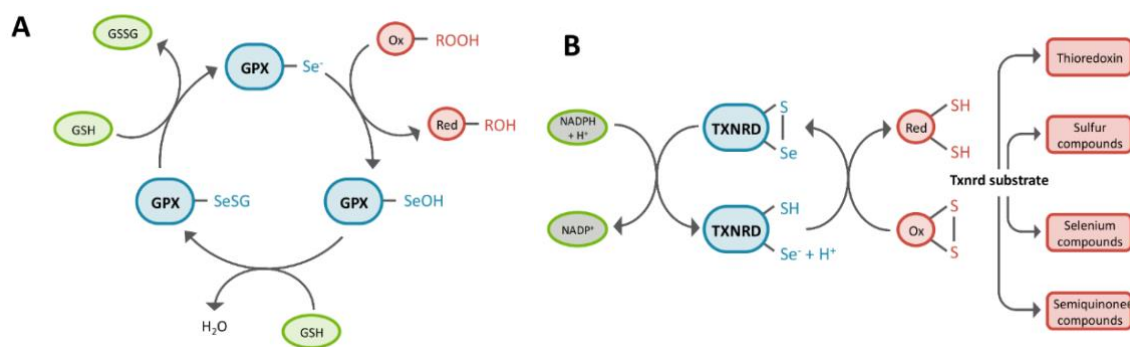
### 1.1.3. Biološka uloga i toksičnost

Biološka aktivnost selena rezultat je njegove ugradnje u tzv. selenoproteine. U ljudskom proteomu otkriveno ih je 25, a atom selena u njima je ugrađen kao dio aminokiseline SeCys. Prozvana je 21. aminokiselinom i genetički je kodirana kodonom UGA (Yang i sur., 2017). SeCys čini aktivno mjesto svih selenoproteina. Središnji spoj metabolizma selena,  $\text{H}_2\text{Se}$ , fosforilira se selenofosfat sintazom 2 (SPS2) u selenofosfat koji se onda uz pomoć selenocistein sintaze veže za serinski ostatak PSer i nastaje selenocisteil tRNA ( $^{\text{SeCys}}$  tRNA).  $^{\text{SeCys}}$  tRNA zatim odlazi u citoplazmu na ribosom i selenocistein se ugrađuje u aminokiselinski slijed specifičnih selenoproteina (Slika 2).



**Slika 2.** Prikaz biosinteze selenoproteina (Roman i sur., 2014)

Tri najvažnije porodice selenoproteina su glutation peroksidaze (GPx1-GPx4 i GPx6), tioredoksin reduktaze (TrxR1-TrxR3) i jodotironin dejodinaze (DIO1-DIO3). GPx katalizira glutation (GSH)-ovisnu redukciju vodikovog peroksida i drugih organskih hidroperoksida u vodu i time sprječava njihovo štetno oksidativno djelovanje na stanične komponente (Slika 3A). Inicijalno, redukcija  $H_2O_2$  uključuje nastanak intermedijera selen kiseline (RSeOH) uz otpuštanje  $H_2O$ . U drugom koraku se zatim RSeOH reducira s molekulom GSH stvarajući intermedijarni glutationil selenol (-Se-SG). Taj intermedijer onda reagira s drugom molekulom GSH nakon čega se stvara molekula oksidiranog glutationa (GSSG), a aktivno mjesto enzima vraća se u prvobitno stanje (RSeH) (Labunsky i sur., 2014). Nadalje, tioredoksin sustav jedan je od najvažnijih redukcijskih sustava u stanicama sisavaca te je u potpunosti ovisan o selenu (Slika 3B). TrxR katalizira NADPH-ovisnu redukciju oksidiranih tioredoksina (Trx), spojeva koji u normalnim fiziološkim uvjetima reduciraju disulfidne krajeve različitih enzima: ribonukleotid-reduktaze (RNR) koja je važna za sintezu DNA, peroksiredoksina (PRX) koji također neutraliziraju ROS vrste, tioredoksin peroksidaze (TrxPx), protein disulfid-izomeraze (PDI), nekih transkripcijskih faktora što rezultira povećanjem transkripcije gena, i mnogih drugih. Osim Trx-a, TrxR može reducirati i ostale male molekule koje u strukturi sadrže sumpor, selen ili oksidiranu semikinonsku grupu te na taj način sudjelovati u ostalim staničnim procesima (Guillin i sur., 2019; Roman i sur., 2014).



**Slika 3.** Prikaz enzimatskih aktivnosti GPx (A) i TrxR (B) (Guillin i sur., 2019)

Treća skupina selenoproteina su jodotironin dejodinaze. To su integralne membranske oksidoreduktaze i izravno su uključene u regulaciju aktivnosti tiroidnih hormona. Naime, većina sintetiziranih hormona koje izlučuje štitnjača je u formi inaktivnog tiroksina ( $T_4$ ). DIO1 i DIO2 kataliziraju pretvorbu inaktivnog  $T_4$ , u aktivni trijodtironin ( $T_3$ ) putem dejodinacije vanjskog fenolnog prstena. S druge strane, za inaktivaciju  $T_3$  u  $T_2$  te za pretvorbu  $T_4$  u inaktivni

reverzni-trijodtironin ( $rT_3$ ), zadužena ja DIO3 (Labunskyy i sur., 2014). Također, pretpostavlja se da je za adekvatnu razinu cirkulirajućih  $T_3$  hormona zadužena DIO1, dok su za njegov status u lokalnom tkivu i stanicama odgovorne DIO2 i DIO3. Precizna lokalna regulacija hormona štitnjače bitna je zbog brojnih fizioloških procesa, ponajprije kod regeneracije nakon oštećenja tkiva ili u samom procesu razvoja tkiva (Gereben i sur., 2008).

Prekomjerman unos selena može uzrokovati ozbiljne toksične učinke ovisno o količini prekomjerno unesenog selena, anorganskog ili organskog porijekla. Podnošljiva gornja granica unosa (eng. *upper limit* - UL) selena koja ne uzrokuje nuspojave ovisne o dozi jest 400  $\mu\text{g}$  kod muškaraca i žena (Institute of Medicine, 2000). Učestalim prekoračenjem te doze raste vjerojatnost da se s vremenom jave nekakvi toksični učinci: slabost, povraćanje, kašalj, dijareja i povremeno tahikardija, a simptomi teškog trovanja javljaju se pri primjeni jako velikih doza, a neki od njih su: groznica, tremor, povećana frekvencija disanja, paraliza, mijelitis, infarkt miokrada i u krajnjem slučaju smrt. Gubitak i lomljivost kose i noktiju najčešći su znakovi selenoze tj. kroničnog trovanja selenom. Ostali simptomi su: zadah koji daje miris na češnjak, metalni okus u ustima, promjene na zubima, kožni osipi, umor, gastrointestinalna iritabilnost i abnormalna funkcija živčanog sustava (razdražljivost, depresija, utrnulost) (Dodig i Čepelak, 2004; Roman i sur., 2014).

## 1.2. Nanoselen

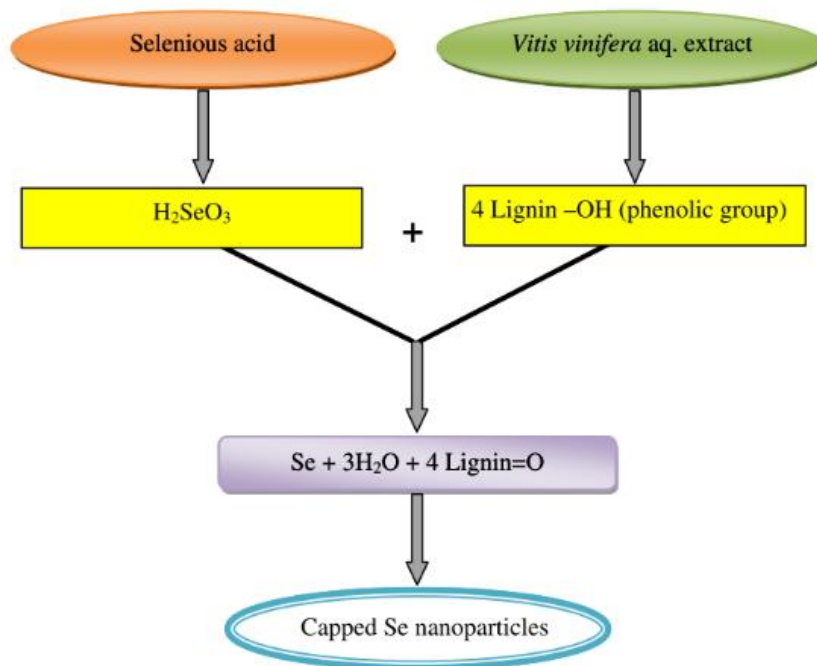
U zadnjih nekoliko godina interes za istraživanje nanočestica i nanomaterijala raspona veličine 0.1-1000 nm značajno je porastao. Sve veći broj saznanja o njihovim specifičnim svojstvima i potencijalno širokoj primjeni u medicini doveli su do velikog porasta znanstvenih radova iz područja nanobiotehnologije. Jedne od najopsežnije proučavanih nanostrukture su i nanočestice selena ( $\text{SeN}\check{\text{C}}$ ). Općenito, potencijal svih nanočestica, pa tako i selenovih, kao inovativnih molekula leži u smanjenju toksičnosti, povećanju biološke aktivnosti i stabilnosti, poboljšanju dopreme lijeka do ciljne stanice i kontroli otpuštanja terapijskih molekula lijeka.

$\text{SeN}\check{\text{C}}$  mogu se sintetizirati fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama, a predstavljaju nakupine elementarnog selena ( $\text{Se}^0$ ) različitih veličina u različitim alotropskim modifikacijama. Elementarni selen dobiva se redukcijom selenita ( $\text{Se}^{4+}$ ) i selenata ( $\text{Se}^{6+}$ ) korištenjem različitih redukcijskih sredstava, pri čemu bezbojna otopina selenita/selenata prelazi u crveno obojenu otopinu nanoselena (Wadhvani i sur., 2016). Fizikalne i kemijske metode sinteze uglavnom

zahtijevaju prilagođene laboratorijske parametre kao što su temperatura, tlak, pH medija, sofisticirane uređaje i veliku količinu štetnih kemikalija. Koriste se najčešće za proizvodnju većih količina nanomaterijala uzrokujući dodatni trošak pri zbrinjavanju upotrebljenih kiselina, lužina i raznih polimera koji zaostaju kao otpad, a najčešće su štetni za okoliš. S druge strane, metode biogene sinteze SeNČ prepoznate su kao potpuno sigurne i neškodljive. Za redukciju bezbojnih selenita/selenata koriste se neke vrste bakterija, gljivica, algi te ekstrakti mnogih biljaka (Husen i Siddiqi, 2014). Bakterije i gljivice sadrže specifične proteine i enzime, najčešće reduktaze, koji reduciraju aplicirani  $\text{SeO}_3^{2-}$  u elementarni  $\text{Se}^0$  tvoreći razne nanosfere koje su u bakterijskoj stanici tim istim proteinima stabilizirani. Bakterije se stoga mogu koristiti za detoksifikaciju poljoprivrednog tla koje sadrži toksične koncentracije selena. Naime, elementarni selen ne može prodrijeti kroz korijen biljke te biljka nije u mogućnosti akumulirati suvišak (Shoeibi i sur., 2017).

### **1.2.1. Biogena sinteza korištenjem biljnih ekstrakata i karakterizacija**

Razni dijelovi biljaka sadrže brojne spojeve s reducirajućim svojstvima koji oksido-redukcijskim reakcijama prevode bezbojnu selenitnu kiselinu u elementarne nanočestice selena crvene boje. To mogu biti reducirajući šećeri, alkoholi, fenoli, flavonoidi, amini, neki proteini i ostali spojevi koji su nakon procesa ekstrakcije obilno zastupljeni u biljnim ekstraktima (Husen i Siddiqi, 2014). Iako točan mehanizam kemijskih reakcija stvaranja  $\text{Se}^0$  nije razjašnjen, predložene su neke sheme kojima se one odvijaju (Slika 4). Točnije, pri FTIR karakterizaciji SeNČ sintetiziranih korištenjem ekstrakta suhog ploda vinove loze (*Vitis Vinifera*), uočeni su oštri pikovi karakteristični za fenolnu skupinu, a koji dokazuju prisutnost biljnog biopolimera lignina. Zaključeno je da je upravo fenolna OH skupina lignina, a malim dijelom i sekundarna OH skupina, odgovorna za redukciju (Sharma i sur., 2014). Osim za redoks reakciju, prethodno navedeni spojevi imaju i ulogu u stabilizaciji sintetiziranih nanočestica, najčešće kao tanki omotač na površini tih čestica koji im daje i dodatna bioaktivna svojstva, ovisno o funkcionalnim grupama na slobodnim krajevima samih čestica. Poznato je da mnogi od spomenutih spojeva, posebice flavonoidi i polifenoli, imaju značajnu ulogu u uklanjanju ROS (eng. *reactive oxygen species*) (Oliviero i sur., 2017) te uklapanjem u nanoselen mogu značajno pridonijeti ukupnom antioksidacijskom učinku. Jedan od primjera su nanočestice selena sintetizirane korištenjem ekstrakta lista nima (*Azadirachta indica*) (Tareq i sur., 2018) ili one sintetizirane korištenjem sjemenke običnog komorača (*Foeniculum vulgare*) (Arif i sur, 2019), gdje je nastali nanoselen pokazao jako dobru antioksidacijsku aktivnost.



**Slika 4.** Shematski prikaz sinteze SeNČ uz pomoć ekstrakta suhog ploda vinove loze (Husen i Siddiqi, 2014)

Za karakterizaciju biogenog nanoselena mogu se koristiti sljedeće tehnike: atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS), Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR), UV-Vis spektroskopija, difrakcija rendgenskih zraka (XRD), transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), elektroforetsko raspršenje svjetlosti (ELS), i dr. Te tehnike omogućavaju uvid u parametre kao što su: veličina i oblik čestica, njihova površina, veličina pora, kristaliničnost, zeta potencijal i stabilnost (Ingale i Chaudhari, 2013). O vrijednostima tih parametara izravno ovisi i potencijalna terapijska primjena.

### 1.2.2. Terapijska primjena

Prihvaćeno je da je antibakterijski učinak nanoselena rezultat vezanja SeNČ na površinu bakterije te otpuštanje selena u obliku iona u bakterijsku stanicu. Smatra se da oni unutar stanice uzrokuju oksidacijski stres, oštećenja DNA te inhibiraju sintezu proteina (Skalickova i sur., 2017). Iako su i antimikrobni i antioksidacijski učinak nanoselena značajno povezani sa stvaranjem selenoproteina, točna povezanost između SeNČ i farmakodinamike te farmakokinetike selenoproteina još nije razjašnjena. SeNČ mogu inhibirati rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija podjednakom učinkovitošću (Hariharan i sur., 2012).

*Staphylococcus aureus* je čest uzročnik infekcija koje se teško liječe zbog stvaranja zaštitnog biofilma i široko rasprostranjene rezistencije na antibiotike. SeNČ reducirane s GSH i stabilizirane goveđim serumskim albuminom pokazale su 60 puta jači učinak na inhibiciju rasta od učinka netretiranja nikakvim agensom. Također, omjer broja živih i mrtvih bakterija pokazao je da su SeNČ ubile otprilike 40% bakterija nakon 3, 4 i 5 h (Tran i Webster, 2011). Iz tih rezultata zaključuje se da bi inhibicijski učinak SeNČ u prvih nekoliko sati rasta (do 5 h) mogao spriječiti *S. aureus* u stvaranju biofilma. Nadalje, meticilin-rezistentan *S. aureus* (MRSA) opasan je patogen otporan na beta-laktamske antibiotike, a odgovoran je za većinu bolnički stečenih infekcija. Rezultati studije u kojoj su se pratila svojstva rasta kod MRSA i stvaranje biofilma nakon apliciranja kompleksa antibiotika (ampicilin, oksacilin, penicilin) i SeNČ, pokazali su višestruko smanjenje otpora bakterija prema tim kompleksima, u odnosu na same antibiotike, kao i povećanu inhibiciju stvaranja biofilma (Cihalova i sur., 2015). Osim antibakterijskog djelovanja, SeNČ pokazuju i antiviralni i antifungalni učinak. Iako je selenijev disulfid (SeS<sub>2</sub>) već dugo poznat kao antifungalni lijek, danas se za terapiju nekih gljivičnih infekcija sve više koriste i SeNČ dobrih antifungalnih svojstava. Jedan od načina inhibicije je putem inhibicije germinacije spora nekih od rodova, npr. *Malassezia* i *Aspergillus* (Shoeibi i sur., 2017).

Antitumorski učinak nanočestica selena pokazan je u tumorima bubrega, pluća, dojke i kostiju. Predloženo je nekoliko mogućih mehanizama djelovanja: (1) povećan oksidacijski stres u tumorskim stanicama, neutralizacija karcinogena i pojačan imunološki odgovor; (2) indukcija apoptoze stanice; (3) inhibicija širenja tumorskih stanica i angiogeneze; (4) zaustavljanje staničnog ciklusa u S fazi; (5) sprječavanje metastaziranja inhibicijom ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP); i (6) mobilizacija endogenog bakra (Wadhvani i sur., 2016). SeNČ pokazuju različitu aktivnost na zdrave i tumorske stanice. Zbog uvjeta visokog osmotskog tlaka, niskog pH i narušene redoks ravnoteže unutar tumorske stanice, SeNČ se ulaskom u malignu stanicu pretvaraju u prooksidativne molekule koje dalje pokreću stvaranje slobodnih radikala i njihovo štetno djelovanje na mitohondrijske i ER membrane. Oštećenja mitohondrijskih membrana uzrokuje izlivanje različitih proteina u citosol i pokretanje apoptoze putem kaspaza (Khurana i sur., 2019). S druge strane, u normalnim staničnim uvjetima SeNČ ne pokazuju štetan učinak te u odnosu na anorganske oblike selena i dalje pokazuju puno manju toksičnost na zdrave stanice. Selektivna dostava u maligne stanice rezultat je i povećane propusnosti kapilara u tkivu zahvaćenom tumorom. Idealna veličina nanočestica za antitumorsku terapiju je 10-100 nm jer su veličine pora kapilara u tumorskim tkivima 100-800 nm, dok u zdravom

tkivu one iznose 2-6 nm. SeNČ te veličine dovoljno su male da izbjegnu retikuloendotelne stanice imunološkog sustava, a dovoljno velike da glomerularnom filtracijom ne budu eliminirane iz tijela (Maiyo i Singh, 2017). Općenito, manje nanočestice pokazuju veću aktivnost i jače citotoksično djelovanje od većih, a u tumorsku stanicu ulaze putem endocitoze. S veličinom čestica povezana je i antioksidativna aktivnost *in vitro*. SeNČ veličine 5-15 nm imaju veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala od onih većih.

Konjugacija s antitumorskim lijekovima još je jedna od korisnih i vrlo značajnih primjena nanoselena. Istraživanja pokazuju veliki potencijal u smanjenju sistemske toksičnosti citostatika inkorporiranih u strukturu SeNČ, prvenstveno zbog ranije spomenute selektivne dostave nanočestica, a onda posljedično i lijekova. Dodatno, zbog svoje antitumorske aktivnosti SeNČ djeluju sinergistički s lijekovima i povećavaju uspješnost liječenja karcinoma. Konjugacija se postiže uklapanjem lijeka u strukturu polimera koji oblaže površinu selenove nanočestice, a koncentracije lijeka koje se mogu vezati za takve nosače veće su od njegove intrinzične topljivosti. Tako vezane molekule lijeka zaštićene su od degradacije i spriječene su uzrokovati sistemske nuspojave (Maiyo i Singh, 2017). Znanstvenici su uspjeli dokazati sinergizam i uspješnu selektivnu dostavu niza lijekova u tumorske stanice. Transferinom konjugirana SeNČ poslužila je kao odličan nosač doksorubicina pokazavši značajno povećani unos doksorubicina u MCF-7 stanične kulture karcinoma dojke, izazivanje apoptoznih procesa i inhibiciju rasta tumora (Huang i sur., 2013). Sinergizam u djelovanju i poboljšanje unosa u stanicu također je pokazan za konjugat 5-fluorouracila i SeNČ koristeći brojne stanične linije (A735, MCF-7, HepG2, Colo201, i dr.) (Liu i sur., 2012). Znatno smanjenje nuspojava primjećeno je kod *in vivo* tretiranja BABL/c golog miša bez štitnjače, cijepljenog s HCT-8 tumorskom staničnom linijom, konjugatom irinotekana i SeNČ. Broj leukocita i trombocita kod miša nakon primjene ostao je na normalnoj razini (Gao i sur., 2014).

### **1.3. Maslina**

Maslina (*Olea europaea L., Oleaceae*) je dugovječno zimzeleno stablo ili grm iz porodice maslina visine 8-10 m. Listovi su mali, kožasti, duguljasti i nalikuju lišću vrbe. Lice lista je svijetlozelene boje, a naličje je srebrnasto. Listovi po granama pravilno su razdijeljeni: uvijek su po dva lista nasuprot, a grana završava s jednim listom. U pazušcima listova smješteni su šiljasti ili okrugli pupovi. Cvjetovi su žuto bijeli, ugodnog mirisa i u obliku grozda. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod. Plod je ovalna koštunica zelene boje, koja mijenja boju

ovisno o periodu sazrijevanja. Dok je plod zelen, meso je gorko. Dozrijevanjem i mjenjanjem boje u tamnoljubičastu ili gotovo crnu gubi se gorčina i povećava se sadržaj ulja u plodu. Za jelo se beru zeleni plodovi, dok se za proizvodnju ulja beru dozreli ljubičasti plodovi. Maslina uspijeva samo u umjereno toplim krajevima gdje se temperatura rijetko spušta ispod ništice, a najpogodnije područje za uzgoj su otoci i priobalje mediteranskog klimatskog područja. Uzgajaju se različite domaće i strane sorte, a najveća prednost daje se sortama prikladnim za dobivanje kvalitetnog ulja i konzerviranje jela (Kantoci, 2006; Kuštrak, 2005).

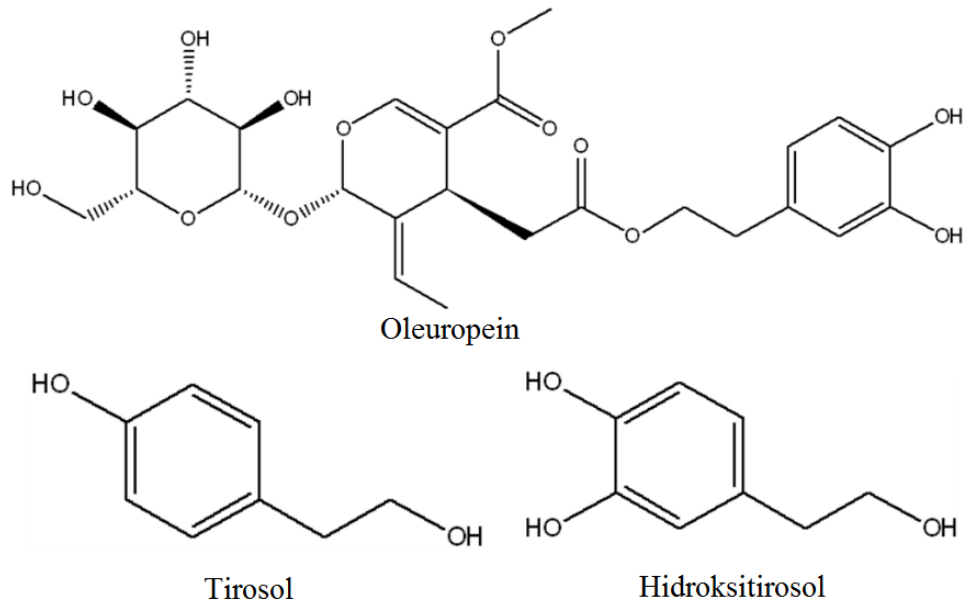
### **1.3.1. Komina masline**

Prilikom procesa proizvodnje maslinovog ulja nastaju velike količine čvrstog ostatka kojeg čini samljevena i iscijeđena koštica, pulpa te kožica ploda masline. Taj ostatak naziva se komina. To je gusta heterogena smjesa tamne boje, intenzivnog mirisa i umjereno kiselog pH. Osim pretežno zastupljenih strukturnih ugljikohidrata, lignina i celuloze, i različitih lipida i proteina, komina masline u manjem udjelu sadrži određenu količinu različitih metala, šećera i bioaktivnih polifenola koji pokazuju značajan antioksidativni učinak. Osim dijelova samljevenog ploda masline, komina sadrži i malu količinu zaostalog ulja i vodu. Samo 2% ukupnih polifenola ekstrahira se u maslinovo ulje, dok ostatak ostaje prisutan u komini. Problem kod komine masline je zbrinjavanje tolike količine otpada nakon proizvodnje maslinovog ulja. Zbog svoje fitotoksičnosti potrebno je primjereno procesuiranje prije odlaganja, što predstavlja dodatni ekonomski trošak proizvođaču. Komina se danas koristi kao hrana za životinje, gnojivo i biogorivo, ali velikim dijelom ostaje neiskorišena. Zbog velike količine antioksidativnih bioaktivnih fenola, komina masline predstavlja vrijednu sirovinu za primjenu u dodacima prehrani, proizvodima s dodanom vrijednošću i preparatima za poboljšanje zdravlja. Ekstrakt komine masline dobiva se ekstrakcijom odmašćenih i suhih ostataka plodova masline nakon proizvodnog procesa sa smjesom etanola i vode kao ekstrakcijskim sredstvom u različitim omjerima (60:40, 80:20). Etanol se naknadno uparuje na rotavaporu, a ekstrakcija se može provoditi centrifugiranjem, ultrazvučnom ekstrakcijom ili u različitim reaktorima s optimiranim parametrima temperature i tlaka (Aliakbarian i sur., 2011; De Bruno i sur., 2018; Nogueira, 2015; Čepo i sur., 2018).



### 1.3.2. Polifenoli komine masline

Fenolni spojevi koji nastaju u biljkama sekundarni su metaboliti i biološki aktivni spojevi. Fenoli masline uz primarno antioksidativno djelovanje pokazuju i ostale pozitivne učinke na zdravlje: protuupalne, kardioprotektivne, hipoglikemijske, antikancerogene i neuroprotektivne. Antioksidativno djelovanje pripisuje se hidroksilnim grupama u *orto*-položaju na aromatskom prstenu, a temelji se na nekoliko kemijskih mehanizama: hvatanju slobodnih radikala i mogućnosti redukcije i keliranja metala. Osim putem kemijskih mehanizama, polifenoli masline imaju sposobnost povećanja razine nekih endogenih antioksidativnih enzima (katalaza, superoksid dismutaza, kinon reduktaza, glutation peroksidaza) aktivacijom određenih elemenata na promotorskoj regiji gena koji kodira za te enzime. Protuupalni učinak postiže se inhibicijom proupalnih enzima ciklooksigenaze, lipooksigenaze, inducibilne NO sintaze, tirozin kinaze, NF- $\kappa$ B te raznih proupalnih citokina kao što su kemokini, faktor nekroze tumora i interleukini (IL-1, IL-6, IL-8). Polifenoli masline također snizuju ukupni kolesterol i trigliceride te poboljšavaju funkciju endotela krvnih žila i na taj način smanjuju incidenciju infarkta miokarda (Obied i sur., 2012). Novija istraživanja pokazuju da sve te učinke postižu i aktivacijom različitih signalnih puteva uključenih u prevenciji upalnih procesa, oksidativnog stresa ili rezistencije na inzulin (Soto-Alarcon i sur., 2017). Najzastupljenije polifenolne komponente komine masline su oleuropein, tirosol, hidroksitirosol i verbaskozid, od kojih oleuropein najčešće u najvećem udjelu (Cioffi i sur., 2010). Tijekom sazrijevanja masline udio oleuropeina se smanjuje, dok se udio tirosola i hidroksitirosola povećava. Svi sadrže najmanje jedan aromatski prsten (C6) na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Slika 5). Nakon konzumacije velika većina svih polifenola masline hidrolizira se u hidroksitirosol koji se apsorbira u tankom crijevu. Zbog snažnog antioksidativnog djelovanja hidroksitirosola, glavni nositelji farmakološkog učinka maslinovog ulja upravo su njegovi derivati (Echeverría i sur., 2017).



**Slika 5.** Kemijska struktura oleuropeina, tirosola i hidroksitirosola (Chin i Ima-Nirwana, 2016)

Veliki problem u današnje vrijeme predstavlja veliki porast unosa sintetskih antioksidansa u ljudski organizam kao npr. butiliranog hidroksianisola (BHA) ili butiliranog hidroksitoluena (BHT) koji se često dodaju prehrambenim proizvodima u svrhu povećanja stabilnosti i otpornosti na oksidativne procese koji dovode do kvarenja. Oni se sve više povezuju s nastankom različitih nuspojava i potencijalom izazivanja nekih patoloških stanja. Iz tog razloga, polifenoli komine masline logično predstavljaju koristan izvor za dobivanje molekula antioksidativnih svojstava i njihovu primjenu, a prvenstveno zbog velike dostupnosti i minimalne cijene (Čepo i sur., 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Komina masline je nusprodukt proizvodnje maslinovog ulja koji zaostaje prilikom procesa tiještenja ploda masline. Zbog visokog sadržaja bioaktivnih polifenola, komina masline ima velik potencijal kao sirovina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Polifenoli komine masline spojevi su s dokazanim antioksidacijskim i protuupalnim učincima te kao takvi postaju cijenjeni kao aktivne sastavnice u razvoju različitih kategorija proizvoda s dodanom vrijednošću (aditivi, kozmeceutici, nutraceutici).

Cilj ovog rada je razviti proces biogene sinteze nanočestica selena korištenjem ekstrakta komine masline kao prirodnog sredstva za oblaganje koje će potencijalno sa selenom ostvarivati i sinergističko antioksidativno djelovanje. Selen kao sastavni dio glutathion peroksidaze djeluje posredno antioksidativno, dok polifenoli imaju izravan učinak na gašenje slobodnih radikala, jaki su reducensi te keliraju metale. Rezultati ovog istraživanja značajno će doprinijeti razvoju saznanja o mogućnostima korištenja ekstrakta komine masline u razvoju nanonutraceutika točnije, mogućnostima primjene spomenutih ekstrakata kao prirodnih funkcionalnih sredstava za oblaganje metalnih nanočestica.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije i pribor

- natrijev selenit, p.a., Kemika d.o.o. Zagreb, Hrvatska
- L-askorbinska kiselina, p.a., Kemika d.o.o. Zagreb, Hrvatska
- 1-etenil-pirolidin-2-on – polivinilpirolidon, p.a., Kemika d.o.o. Zagreb Hrvatska
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) – ABTS (Sigma, St. Luis, SAD)
- kalijev persulfat, p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens, Fluka, Buchs, Švicarska
- bezvodni natrijev karbonat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- etanol, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- ultračista voda (MiliQ-H<sub>2</sub>O)
- Erlenmayerove tikvice širokog grla (250 mL)
- odmjerne tikvice (10 mL, 100 mL)
- Falcon kivete (50 mL)
- Eppendorf kivete (2 mL)
- graduirane pipete (1 mL, 20 mL)
- trbušasta pipeta (10 mL)
- automatske mikropipete
- multikanalna pipeta Rainin Crux (Mettler-Toledo, SAD)
- pinceta za magnetske miješalice
- polipropilenska ploča ravnog dna s 96 jažica kapaciteta 330  $\mu$ L (Thermo Scientific 130188 BioLite 96 1/Sleeve, SAD)

#### 3.1.2. Instrumenti

- Analitička vaga, AB265-S, Metler Toledo, Indija
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Japan
- Čitač mikrotitarskih pločica, Multimode Plate Reader – Victor X3, Perkin Elmer, Massachusetts, SAD

- Foton korelacijski spektrofotometar, Zetasizer Nano ZS, Malvern UK
- Liofilizator Alpha 1-4 LOC-1, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Centrifuga, Centric 322A, Tehnica, Slovenija

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema suhog ekstrakta komine masline

Ekstrakcija komine masline provodi se na način da se na 10 g komine masline doda 200 ml 60% etanola. Ekstrakcija se provodi na 70 °C tijekom 2 sata uz snažno protresanje (80-100 rpm). Dobiveni ekstrakti profiltriraju se kroz gusti filter papir, a etanol se upari na rotavaporu. Nakon uklanjanja etanola, tekući ekstrakti se liofiliziraju, a suhi ekstrakt komine masline (EM) se pohranjuje u zatvorenoj posudi na -4 °C.

### 3.2.2. Biogena sinteza nanočestica selena

Biogena sinteza nanočestica selena provodila se korištenjem različitih volumena 1%-tne otopine suhog ekstrakta komine masline u reakcijskim smjesama jednakog krajnjeg volumena. Na taj način istražen je utjecaj različite koncentracije ekstrakta komine masline na rezultate sinteze.

Priprema ekstrakta komine masline:

Za pripremu 1% otopine ekstrakta komine masline odvaži se 500 mg suhog ekstrakta komine masline u 50 mL ultračiste vode (miliQ-H<sub>2</sub>O). Ekstrakti komine neposredno prije sinteze filtriraju se kroz HPLC filtre (polikarbonatni filtri 0,4 μm).

Priprema otopine natrijevog selenita:

Za pripremu 10 mL otopine Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> potrebno je izvagati 0,1729 g Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0,1 mol/L) i otopiti u malo ultračiste vode (miliQ-H<sub>2</sub>O) u čaši. Sve prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti s miliQ-H<sub>2</sub>O do oznake.

Priprema otopine L-askorbinske kiseline:

Za pripremu 100 mL otopine L-askorbinske kiseline potrebno je izvagati 1,7613 g L-askorbinske kiseline (0,1 mol/L) izravno u odmjernu tikvicu od 100 mL te otopiti u miliQ-H<sub>2</sub>O. Zbog nestabilnosti L-askorbinska kiselina otapa se netom prije postupka sinteze.

Priprema otopine polivinilpirolidona:

Za pripremu 100 mL 1%-tne otopine PVP-a potrebno je izvagati 1 g PVP-a u čaši, otopiti ga u malo miliQ-H<sub>2</sub>O, sve prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake.

Postupak:

U reakcijsku posudu (Erlenmayerova tikvica širokog grla, 250 mL) doda se 10 mL-askorbinske kiseline, zadani volumeni ekstrakta komine masline i miliQ vode (kako je navedeno u Tablici 1). Reakcijska smjesa postavi se na magnetsku miješalicu, u nju se ubaci magnetski mješač i brzina miješanja podesi se na 3 (na starijim magnetskim miješalicama na maksimum). Odgovarajuća brzina miješanja jest ona pri kojoj dolazi do laganog pjenjenja reakcijske smjese. U reakcijsku smjesu se tada doda kap po kap 1 mL Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> brzinom 1 kap/2s. Već tijekom dodavanja Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> otopina mijenja boju u crvenu. Reakcijsku smjesu potrebno je pustiti 20 minuta da se miješa počevši od trenutka dodavanja prve kapi selenita. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa prebacuje se u kivete za centrifugiranje (50 mL) i centrifugira 20 min na 8000 g. Supernatant se odlije, a u istaložene nanočestice doda se 15 mL miliQ-H<sub>2</sub>O. Uzorak se vorteksira kako bi se talog redispergirao i pročistio te se ponovno centrifugira 20 min na 8000 g. Nakon drugog centrifugiranja supernatant se dekantira i talog redispergira u 5 mL miliQ-H<sub>2</sub>O. Suspenzija se alikvotira u 2 Eppendorf kivete ( 2 mL) za daljnja ispitivanja: određivanje veličine čestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti i određivanje antioksidacijskog potencijala. Kao pozitivna kontrola ovog sintetskog procesa koristi se kemijska sinteza nanočestica selenita uz pomoć PVP-a (uzorak 0).

**Tablica 1.** Shema pripreme reakcijskih smjesa

Uzorak	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (0,1M) / mL	L-ask (0,1M) / mL	EM (1%) / mL	miliQ-H <sub>2</sub> O / mL	γ (EM) / g L <sup>-1</sup>
0	1	10	9 (PVP)	9	0
1	1	10	2	16	0,345
2	1	10	2	16	0,345
3	1	10	5	13	0,862
4	1	10	5	13	0,862
5	1	10	7	11	1,724
6	1	10	7	11	1,724
7	1	10	10	8	2,414

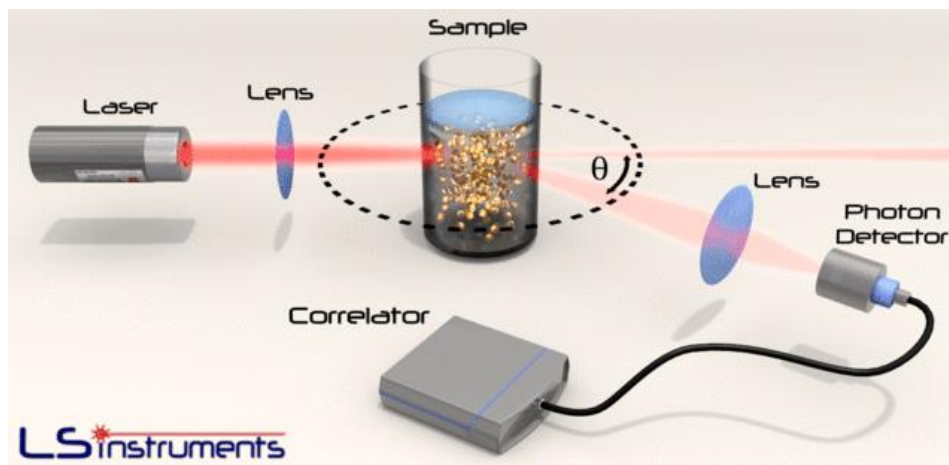
\*L-ask: L askorbinska kiselina; \*\*EM: ekstrakt komine masline

### 3.2.3. Određivanje veličine nanočestica korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (*Dynamic Light Scattering, DLS*)

Stabilnost sintetiziranih nanočestica, odnosno proces njihove agregacije može se pratiti na temelju promjene njihove veličine i zeta potencijala. Pri određivanju veličine čestica i njihove raspodjele mogu se koristiti različite metode, a jedna od najčešće korištenih i najbržih metoda kod određivanja veličine nanočestica u suspenzijama je mjerenje dinamičkog raspršenja svjetlosti, poznato i kao foton korelacijska spektroskopija. Temelji se na mjerenju Brown-ovog gibanja čestica u suspenziji i povezuje ga s veličinom tih čestica preko Stokes-Einstein-ove jednadžbe (Maguire i sur, 2018). Brown-ovo gibanje je nasumično gibanje čestica koje pretpostavlja neprestano međusobno sudaranje s molekulama otapala. Što su te čestice veće, manja je razlika između broja molekula koje su se sudarile s česticama s pojedinih strana i to se manje ističe njihovo Brownovo gibanje. Čestice u suspenziji izlažu se monokromatskom koherentnom laserskom snopu svjetlosti nakon čega raspršeno zračenje pada pod određenim kutom na detektor (Slika 6). Analiza fluktuacije raspršenog zračenja daje informaciju o gibanju čestica. Fluktuacije intenziteta raspršenog zračenja koje se mjere na detektoru s vremenom se pretvaraju u električne impulse na temelju kojih se konstruira vremenski ovisna korelacijska funkcija iz koje se onda različitim algoritmima određuje veličina čestica. Naime, analizom korelacijske funkcije dobiva se vrijednost difuzijskog koeficijenta  $D$  koji je zatim povezan s hidrodinamičkim polumjerom čestica  $R_H$  preko Stokes-Einstein-ove jednadžbe [1]:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_H} \quad [1]$$

gdje je  $k_b$  Boltzmanova konstanta,  $T$  temperatura suspenzije, a  $\eta$  viskoznost medija. Hidrodinamički polumjer predstavlja hipotetski polumjer čestice sferičnog oblika koja se kreće tj. difundira kroz koloidnu disperziju jednakom brzinom kao i čestica analizirana DLS metodom. U realnim uvjetima dispergirane čestice same su po sebi nepravilnog oblika te najčešće solvativane molekulama otapala što dodatno narušava sferični oblik, stoga DLS pruža samo pretpostavku o stvarnoj veličini koloidnih čestica. No za potrebe primjene metode to je sasvim dovoljno. Metoda je neinvazivna, postupak pripreme uzoraka za mjerenje sveden je na minimum te nije potrebna opetovana kalibracija instrumenta neposredno prije mjerenja. Primjenjuje se pri karakterizaciji u različitim disperzijskim sustavima npr. emulzijskim, micelarnim, polimernim, proteinskim, koloidnim i sustavima disperzije ostalih nanočestica. (Bhattacharjee, 2016).



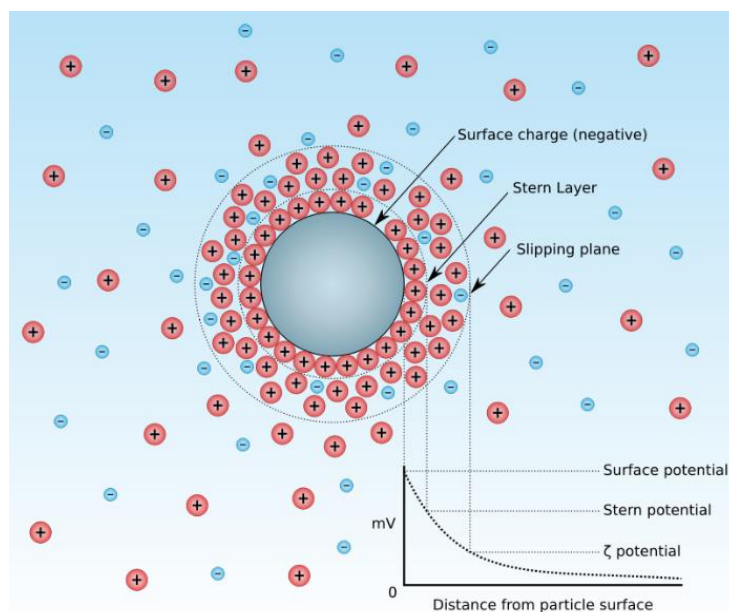
**Slika 6.** Vizualizacija principa DLS metode: prolazak laserske zrake kroz uzorak i detekcija raspršenog zračenja pod određenim kutom (preuzeto sa: [www.lsinstruments.ch](http://www.lsinstruments.ch))

Veličina nanočestica selena u mjernim sustavima određena je mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti na foton korelacijskom spektrofotometru Zetasizer Nano ZS, sa „zelenim“ laserom ( $\lambda = 532$  nm) pri temperaturi od 25 °C. Intenzitet raspršene svjetlosti mjeren je pri kutu od 173°. Dobivene korelacijske funkcije analizirane su algoritmima u Zetasizer programskom paketu. Svaki uzorak mjeren je šest puta. Rezultati su prikazani kao raspodjela veličine čestica po volumenu. Mjerenja su ponovljena nakon 48 i 96 h na svim uzorcima.



### 3.2.4. Mjerenje zeta potencijala

Zeta potencijal, poznat i kao elektrokinetički potencijal jest razlika potencijala između površine čestice i plohe smicanja dvostrukog električnog sloja koji okružuje jezgru koloidne čestice (Slika 7). Taj sloj se sastoji od dva dijela: unutrašnji sloj (Sternov) gdje su ioni čvrsto povezani s jezgrom čestice i vanjski (difuzni) sloj gdje su ioni slabije povezani s česticom (Salopek i sur., 1992). Zeta potencijal zapravo predstavlja naboj koji se javlja na česticama i jedan je od ključnih pokazatelja stabilnosti disperzijskog sustava. Povećanje vrijednosti zeta potencijala ili debljine električnog dvosloja rezultira povećanjem elektrostatskih odbijanja, a ono izravno pridonosi smanjenju flokulacije i agregacije čestica u disperziji. Zeta potencijal uz ionsku jakost i koncentraciju najviše ovisi o pH medija. Ovisno o kiselosti i lužnatosti medija može varirati od više pozitivne do više negativne vrijednosti. pH pri kojem je zeta potencijal jednak nuli naziva se izoelektrična točka. Približavanjem pH izoelektričnoj točki, disperzni sustavi gube stabilnost i dolazi do aglomeracije čestica. Jedna od najpopularnijih primjena podataka o zeta potencijalu jest u ispitivanju stabilnosti koloidnih sustava. Smjernice prihvaćene u literaturi klasificiraju nanočestice zeta potencijala  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV,  $\pm 20-30$  mV i  $> \pm 30$  mV kao vrlo nestabilne, relativno stabilne, umjereno stabilne i vrlo stabilne. Iako zeta potencijal daje vrlo korisne informacije o odbojnim elektrostatičkim silama, ne uzima u obzir privlačne van der Waals-ove interakcije zbog čega sustav s visokim zeta potencijalom ne mora nužno biti stabilan i obrnuto.



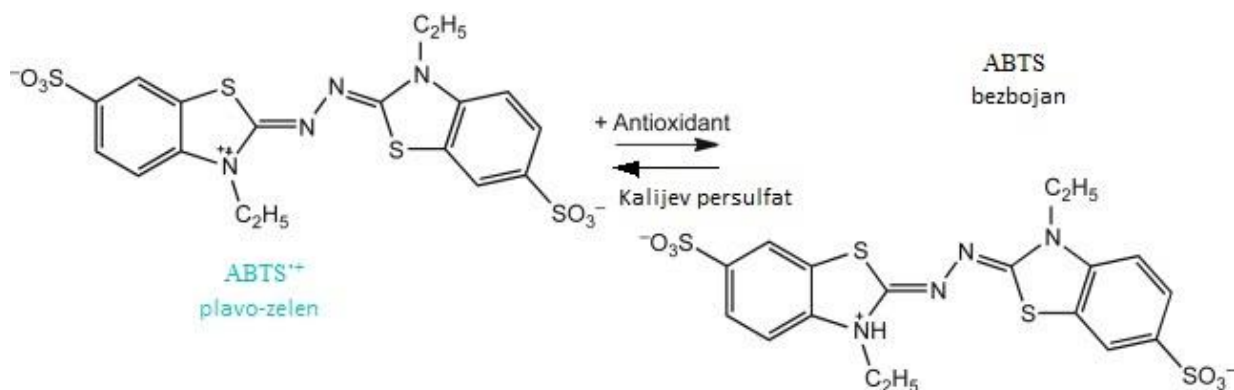
**Slika 7.** Shematski prikaz električnog dvosloja koloidne čestice (preuzeto sa: [https://bs.wikipedia.org/wiki/Zeta\\_potencijal](https://bs.wikipedia.org/wiki/Zeta_potencijal))

Vrijednosti zeta potencijala uobičajeno se određuju mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica u uzorku metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *Electroforetic Light Scattering*, ELS). Tehnika se najčešće koristi u kombinaciji s tehnikom koja koristi DLS unutar istog uređaja (npr. Malvern Zetasizer<sup>®</sup>) pa se na taj način omogućuje istovremena integrirana analiza veličine čestica i zeta potencijala uzorka (Bhattacharjee, 2016).

Za mjerenje zeta-potencijala nanočestica selena korišten je Zetasizer nano ZS. Uzorak za mjerenje pripremio se pipetiranjem primarnog uzorka i destilirane vode u omjeru 1:1 u kivetu s ugrađenim bakrenim elektrodama za mjerenje zeta potencijala. Svaki uzorak je mjeren tri puta.

### **3.2.5. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom**

TEAC (engl. Trolox equivalent antioxidant capacity) jest metoda kojom se ispituje antioksidativni kapacitet nekog uzorka mjerenjem smanjenja apsorbanције reakcijske otopine. Spoj čija se apsorbancija prati jest ABTS<sup>•+</sup> kation radikal (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) koji se u prisutnosti antioksidansa neutralizira tj. reducira i gubi svoje karakteristično plavo-zeleno obojenje (Miller i sur., 1993) (Slika 8). ABTS radikal kation generira se direktnim miješanjem otopina ABTS-a i kalijevog persulfata u omjeru 1:1 pri čemu kalijev persulfat služi kao oksidans. Nakon pripreme, radikal je potrebno zbog njegove nestabilnosti čuvati na mračnom mjestu i pri sobnoj temperaturi barem 12 h kako bi bio spreman za daljnje korištenje. Antioksidativni kapacitet proporcionalan je smanjenju apsorbancije ABTS<sup>•+</sup>-a koji ima svoje apsorpcijske maksimume na 415, 645, 734 i 815 nm. Kako bi se izbjegle interferencije drugih komponenti pri nižim valnim duljinama, valna duljina pri kojoj se najčešće mjeri obezbojenje ABTS<sup>•+</sup>-a u prisutstvu prirodnih ekstrakata je 734 nm. Prednost ove metode jest mogućnost primjene u hidrofiličnim i lipofiličnim sustavima zbog vrlo dobre topljivosti radikala u vodi i organskim otapalima. Metoda nije tehnički zahtjevnija te omogućava rutinska mjerenja (Re i sur., 1999). Antioksidativni potencijal uzorka izražava se kao mg ekvivalenta Troloxa (TE) u L ekstrakta. Trolox<sup>®</sup> jest hidrosolubilni oblik vitamina E te se pored ostalih spojeva (galna kiselina, askorbinska kiselina, rutin) najčešće koristi kao referentna tvar.



**Slika 8.** Neutralizacija ABTS radikala u prisutnosti antioksidansa (preuzeto sa: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com))

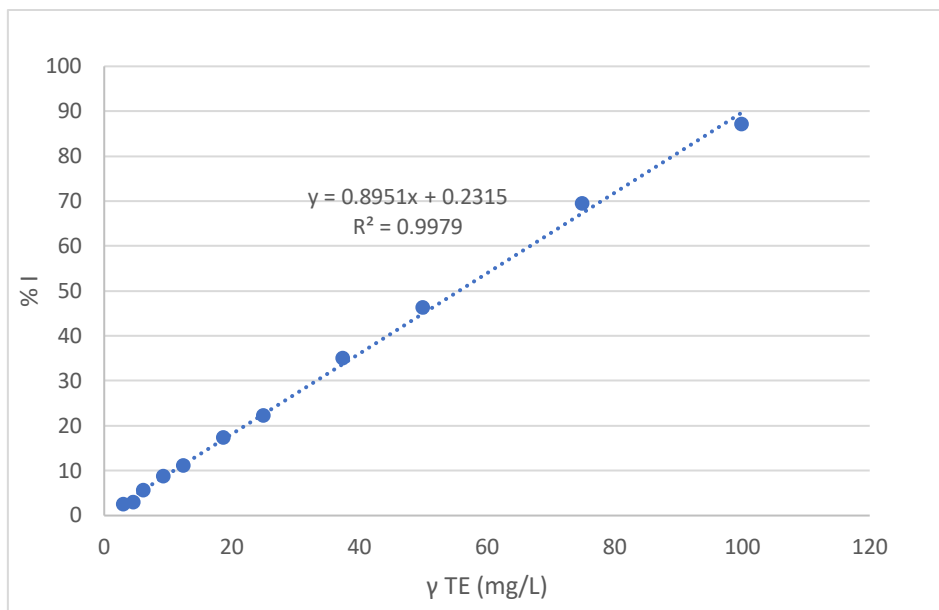
Reagensi:

Za pripremu 7 mM stock otopine ABTS-a potrebno je otopiti tabletu od 10 mg ABTS-a u 2,778 mL destilirane vode.

Za pripremu 2,45 mM otopine  $K_2S_2O_8$  potrebno je izvagati 4,41 mg  $K_2S_2O_8$ , prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL, otopiti u 5 mL destilirane vode i nadopuniti do oznake.

Otopina ABTS radikala pripravlja se miješanjem jednakih volumena otopina ABTS-a i  $K_2S_2O_8$  (2,778 mL) te se pohranjuje na sobnoj temperaturi na mjestu zaštićenom od svjetlosti na 12-16 h dok reakcija ne završi. Nakon 12 h, otopinu ABTS radikala potrebno je adekvatno razrijediti kako bi njena apsorbancija pri 734 nm približno iznosila  $0,7 \pm 0,02$ . Na taj način omogućeno je praćenje smanjenja apsorbancije u mjernom području. U tu svrhu 1 mL otopine ABTS radikala razrijedi se u plastičnoj kadici s 19 mL destilirane vode (20x razrijeđenje) te se takva razrijeđena otopina koristi u ispitivanju uzoraka.

Za pripremu stock otopine Troloxa koncentracije 1 mg/ml potrebno je izvagati 5 mg Trolox®-a u odmjernu tikvicu od 5 mL te 96% etanolom nadopuniti do oznake. Baždarni dijagram (Slika 9) izradi se mjerenjem apsorbancije radnih otopina poznatih koncentracija Trolox®-a u rasponu 3-100 mg/L pripremljenih razrijeđivanjem primarne otopine Troloxa etanolom. Pomoću baždarnog dijagrama očitavaju se vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzorka kao ekvivalenti Troloxa®.



**Slika 9.** Baždarni dijagram: Ovisnost smanjenja apsorbancije o koncentraciji Trolox-a

*I-postotak gašenja apsorbancije; TE-ekvivalenti Troloxa*

Mjerne otopine izrađuju se dodavanjem 4 μL uzorka i 16 μL destilirane vode u jažicu mikrotitarske pločice. U tu smjesu dodaje se 200 μL prethodno adekvatno razrijeđenog ABTS radikala (razrijeđeno na način da mu apsorbancija na 734 nm bude  $0.700 \pm 20$ ). Kontrolni uzorak sadrži 20 μL destilirane vode i 200 μL razrijeđenog ABTS radikala. Mikrotitarska pločica s uzorcima unese se u čitač mikrotitarskih pločica te se postavi lagano miješanje pločice prvih 60 s, nakon čega se inkubira još 90 s na 30°C (ukupno 3 min od dodatka reagensa). Nakon završetka inkubacije očita se vrijednost apsorbancije na 734 nm. Analiza se provodila u četveroplikatu za svaki od sedam pripremljenih uzoraka i kontrolni uzorak. Postotak gašenja apsorbancije (I) izračuna se prema formuli [2]:

$$\%I = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad [2]$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija samog ABTS radikala nakon adekvatnog razrijeđenja (slijepa proba), a  $A_1$  apsorbancija uzorka nakon 3 minute (reakcijska otopina).

### 3.2.6. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

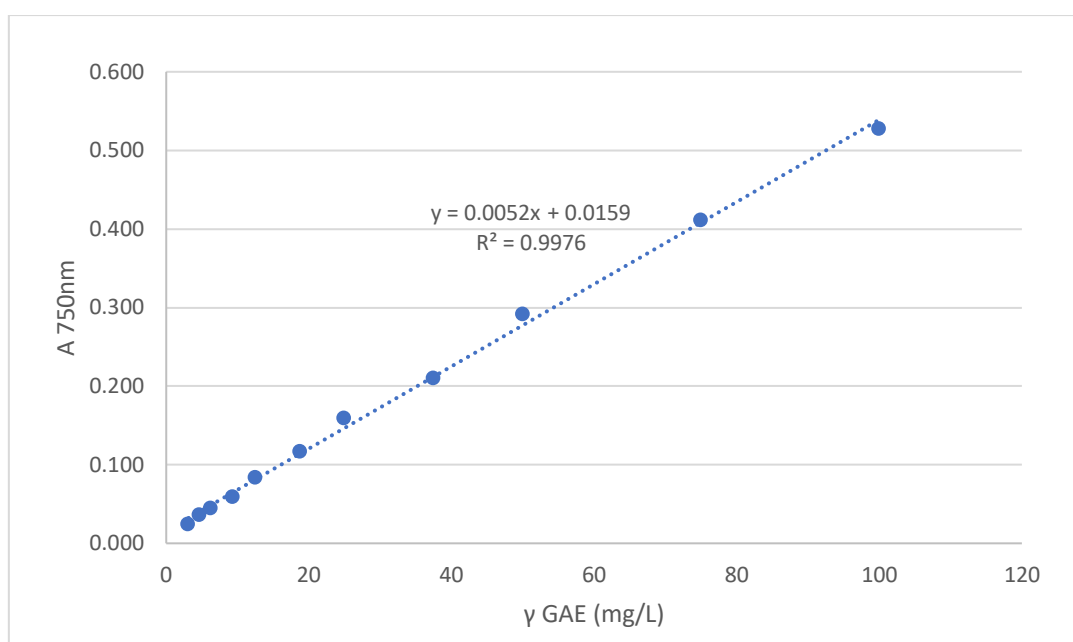
Folin-Ciocalteu (FC) metoda koristi se za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih reducirajućih komponenti (kao što su polifenoli) u uzorku. Metoda se temelji na prijenosu elektrona s hidroksilne skupine polifenola ili drugih redukcijskih molekula prisutnih u uzorku na komplekse fosfomolibdata i fosfovolframata nepoznate kemijske strukture koji zajedno u smjesi čine Folin-Ciocalteu reagens. Žuto obojenje Folin-Ciocalteu reagensa nakon dodatka otopine uzorka koji sadrži reducirajuće spojeve prelazi u plavo. Plavo obojenje proporcionalno je količini redukcijskih komponenti te se njihov sadržaj određuje mjerenjem apsorbancije pri 750-765 nm. Reakcija se provodi u alkalnom mediju pri čemu se fenolne sastavnice deprotoniraju i formiraju fenolatni ion koji brže reagira s reagensom. Prijenos elektrona na Folin-Ciocalteu reagens nije specifičan za fenolne spojeve pa zajedno s fenolima mogu reagirati i brojne druge komponente ne-fenolne strukture kao što su npr. aromatski amini, razni reduktivni šećeri, askorbinska kiselina, sumporni dioksid iz vina i dr. Iz tog razloga bitno je, ukoliko se metoda koristi u svrhu kvantifikacije ukupnih fenola u uzorku, sigurno isključiti mogućnost interferencije ostalih sastavnica. Ukupni redukcijski potencijal ispitivanog uzorka izražava se kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) u L ispitivane otopine (Singleton i sur., 1999). Folin-Ciocalteu metoda je brza, jednostavna i ponovljiva. Reagens je komercijalno vrlo dostupan, a sama metoda je predložena kao standardna metoda za korištenje u rutinskoj kontroli kvalitete raznih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani te određivanju njihovog antioksidacijskog potencijala (Prior i sur., 2005). Autori preporučuju korištenje više bioloških i tehničkih replikata tijekom eksperimenta zbog uobičajeno velike varijabilnosti među biološkim uzorcima. Primjer za to su uzorci listova i plodova raznih biljaka kojima sadržaj polifenola može značajno varirati zbog različitih uvjeta uzgoja, skladištenja i stresnih čimbenika iz okoliša (Ainsworth i Gillespie, 2007).

Reagensi:

Komercijalni Folin-Ciocalteu reagens potrebno je razrijediti s destiliranom vodom. U tu svrhu 2 mL komercijalnog Folin-Ciocalteu reagensa razrijedi se u plastičnoj kadici s 18 mL destilirane vode (10%) te se takva razrijeđena otopina koristi u ispitivanju uzoraka.

Za pripremu 20 mL 700 mM otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  potrebno je izvagati 1,4839 g bezvodnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , otopiti u malo destilirane vode u čaši i prokuhati. Nakon zagrijavanja otopinu je potrebno ohladiti, kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopuniti do oznake.

Baždarni dijagram (Slika 10) izradi se mjerenjem apsorbancije radnih otopina poznatih koncentracija galne kiseline u rasponu 3-100 mg/L pripremljenih razrijeđivanjem primarne otopine standarda galne kiseline. Pomoću baždarnog dijagrama izračuna se ukupan sadržaj polifenola izražen u ekvivalentima galne kiseline.



**Slika 10.** Baždarni dijagram: ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline  
*GAE-ekvivalenti galne kiseline*

Mjerne otopine uzoraka izrade se pipetiranjem 4  $\mu\text{L}$  ekstrakta komine masline i 16  $\mu\text{L}$  destilirane vode u jažicu mikrotitarske pločice. Nakon toga u jažicu se odmah dodaje 50  $\mu\text{L}$  10% Folin-Ciocalteu reagensa. Mikrotitarska pločica s uzorcima unese se u čitač mikrotitarskih pločica te se postavi lagano miješanje pločice prvih 60 s, nakon čega se inkubira još 210 s na 37°C (ukupno 5 min od dodatka reagensa). Nakon završetka prve inkubacije dodaje se u svaku jažicu po 160  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  za stvaranje alkalnog medija pogodnog za reakciju. Sve se ponovno unese u čitač i postavi miješanje prvih 60 s, nakon čega se ostavi inkubirati još 1710 s na 37°C (ukupno 30 min od dodatka  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Nakon završetka inkubacije očita se vrijednost apsorbancije na 750 nm. Sadržaj ukupnih fenola izražen u ekvivalentima galne kiseline (GAE) odredi se korištenjem baždarnog dijagrama. Analiza se provodila u četverplikatu za svaki od sedam pripremljenih uzoraka.

### **3.2.7. Statistička obrada podataka**

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i GraphPad Prism 8.4.2 programi. Analiza veličine čestica uzoraka provedena je u šesteroplikatu (raspodjela veličine čestica i zeta potencijal) (n=6); zeta potencijala u triplikatu (n=3), a antioksidativne aktivnosti u četveroplikatu (n=4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne i relativne standardne devijacije. Za usporedbu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance uz provođenje post hoc Tukey-evog testa. Uzorci su statistički značajno različiti ako je  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Veličina i stabilnost biogeno sintetiziranih nanočestica selena

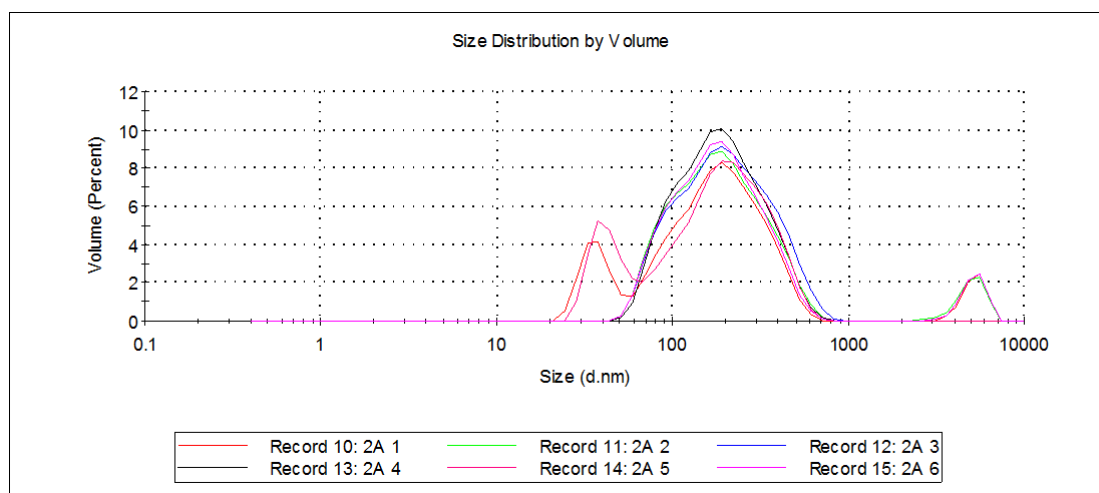
Mjerenje veličine sintetiziranih nanočestica selena provedeno je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Analizirano je sedam uzoraka gdje je kao sredstvo za oblaganje u sintezi korišten ekstrakt komine masline u različitim koncentracijama (bnSe1-bnSe4; Tablica 2). Kao pozitivna kontrola analiziran je jedan uzorak u kojem nije bilo ekstrakta, već je kao sredstvo za oblaganje u sintezi upotrebljen PVP (*uzorak nSe*). Na taj način istražen je utjecaj različitih koncentracija ekstrakta komine masline na karakteristike sintetiziranih nanočestica.

Tablica 2. Oznake analiziranih uzoraka

	$\gamma$ (EM*) / g/L
nSe	0
bnSe1	0,345
bnSe2	0,862
bnSe3	1,724
bnSe4	2,414

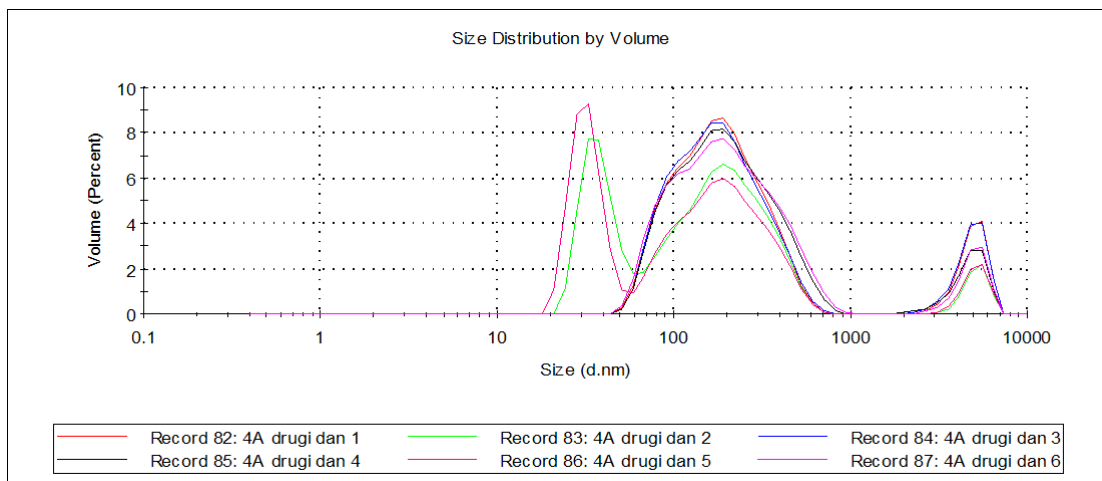
\*EM-ekstrakt komine masline

Hydrodinamički promjer čestica dobiven je iz prosječne vrijednosti šest mjerenja, a rezultati mjerenja grafički su prikazani kao raspodjela veličine čestica po volumenu (Slike 11-15).

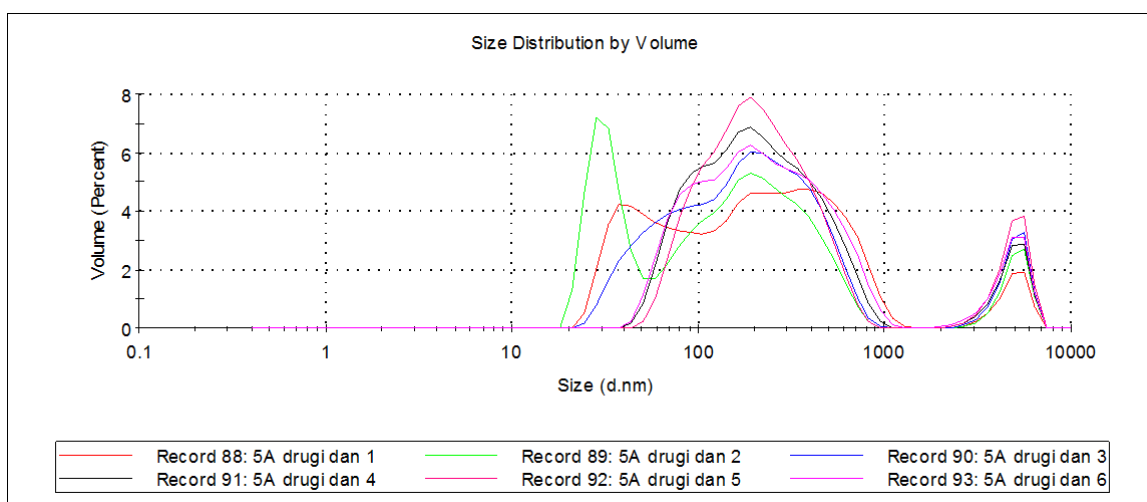


Slika 11. Raspodjela veličine čestica po volumenu za uzorak bnSe1

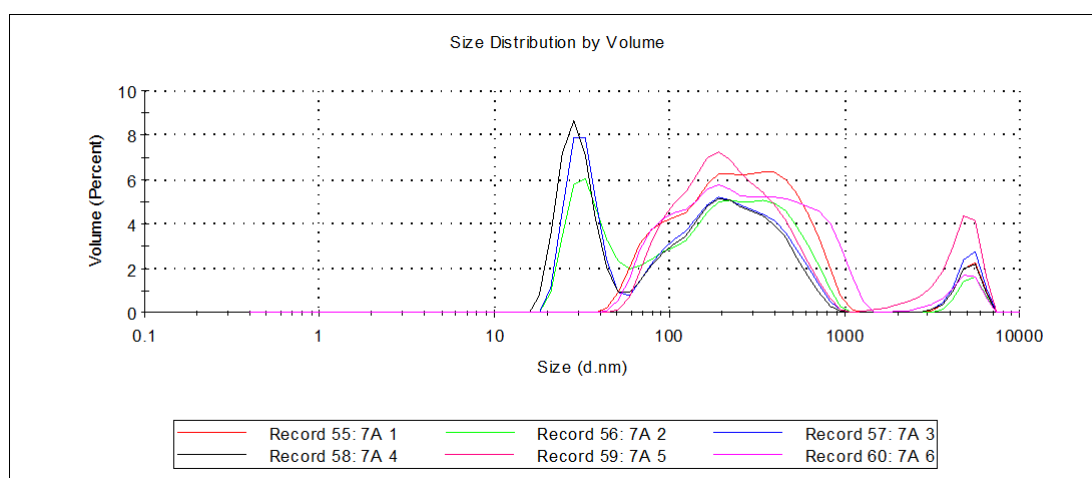




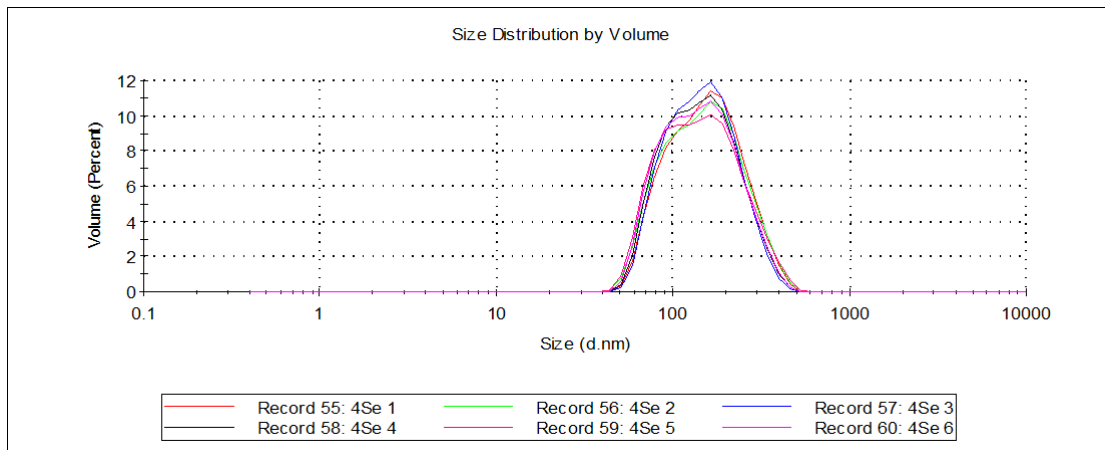
Slika 12. Raspodjela veličine čestica po volumenu za uzorak bnSe2



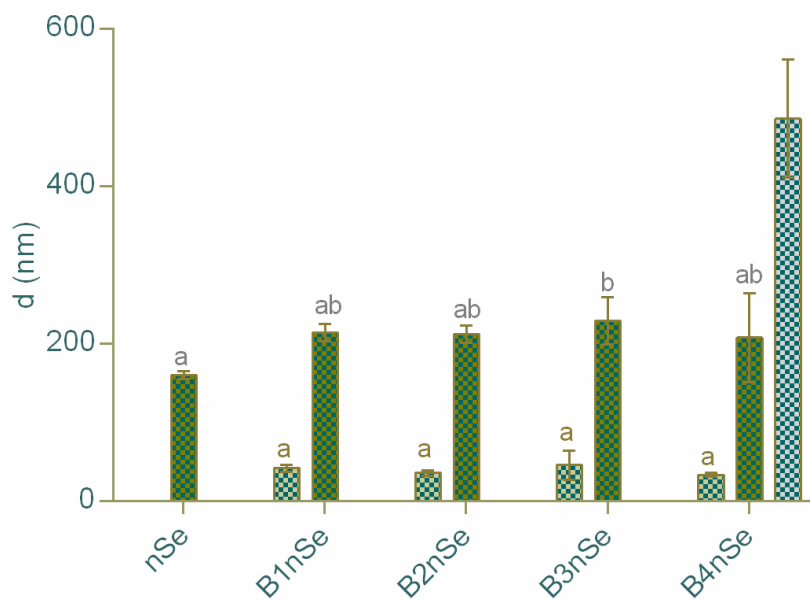
Slika 13. Raspodjela veličine čestica po volumenu za uzorak bnSe3



Slika 14. Raspodjela veličine čestica po volumenu za uzorak bnSe4



**Slika 15.** Raspodjela veličine čestica po volumenu za uzorak kemijski sintetiziranog nanoSe



**Slika 16.** Prosječan promjer nanočestica u analiziranim uzorcima

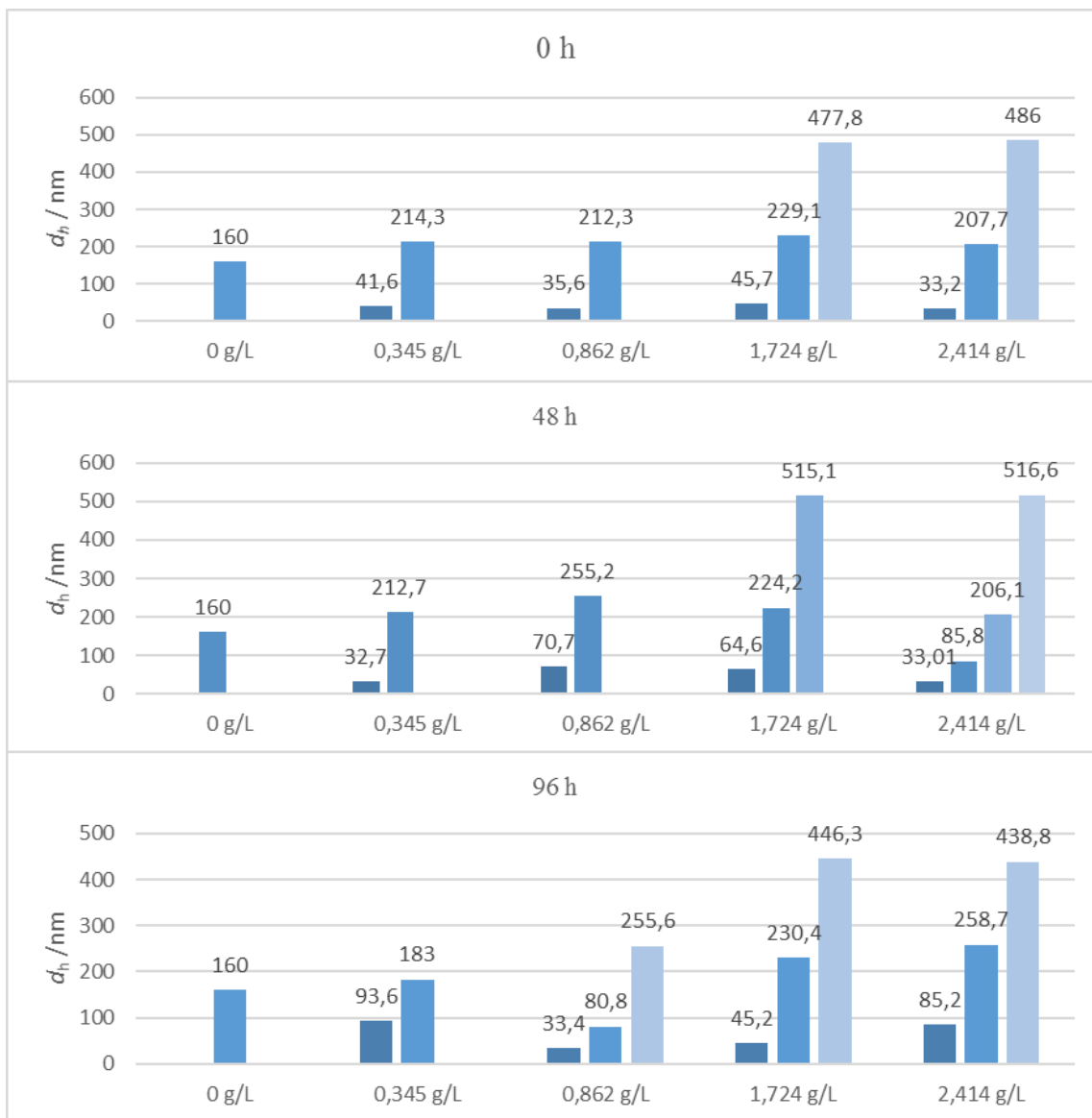
*Podaci istog skupa, označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )*

Iz dijagrama raspodjele veličine čestica po volumenu za sva četiri uzorka uočeno je da su u svim uzorcima prisutne čestice raspona veličine od 30 nm pa sve do 600 nm. Za čestice veličine iznad 1500 nm pretpostavljamo da su nečistoće iz EM obzirom da nisu prisutne u uzorku sa kemijski sintetiziranim nSe. Uzorak bnSe1 ( $\gamma$  (EM\*)= 0,345 g/L), sadržavao je dvije frakcije čestica: 90,4% čestica bilo je prosječne veličine 214,3 nm, a manji dio prosječne veličine 41,6 nm. Uzorak bnSe2 ( $\gamma$  (EM\*)= 0,862 g/L) također je sadržavao dvije frakcije čestica: oko 79,4% čestica prosječne veličine 212,3 nm i manji dio veličine 35,6 nm. U uzorku bnSe3 ( $\gamma$  (EM\*)= 1,724 g/L) u jednom mjerenju zabilježen je i mali udio treće frakcije čestica prosječne veličine 477,8 nm. Većinu, u prosjeku 74,3% činila je frakcija čestica prosječne veličine 229,1 nm. U uzorku s najvećom koncentracijom ekstrakta ( $\gamma$  (EM\*)= 2,414 g/L) bnSe4 zabilježene su također tri skupine čestica od kojih je u prosjeku 56,7% opet najzastupljenija bila frakcija s prosječnom veličinom čestica od 207,7 nm, no značajnu količinu, oko 39,8% u prosjeku činila je i treća frakcija čestica prosječne veličine 486 nm.

Iz dobivenih rezultata proizlazi da su sintetizirana uglavnom dva tipa nanočestica selena, jedna frakcija vrlo malih nanočestica prosječne veličine oko 35 nm i veća frakcija nanočestica prosječne veličine oko 215 nm (Slika 16). Kao pozitivna kontrola kemijskom sintezom sintetizirane su nanočestice selena s omotačem od PVP-a (*uzorak nSe*). Prosječna veličina tih nanočestica iznosila je 160,1 nm. Kemijskom sintezom uobičajeno nastaju puno jednoličnije čestice tj. pojavljuje se uglavnom samo jedna frakcija. Veća prosječna veličina nanočestica sintetiziranih uz pomoć ekstrakta komine masline (~215 nm) u odnosu na nanočestice dobivene kemijskom sintezom (~160 nm) može se objasniti usporedbom njihovih struktura. Polifenoli masline veće su molekule i razgranatije strukture od PVP-a i pretpostavlja se da kao takve tvore deblji omotač oko selenove jezgre. Također uočeno je da se povećanjem koncentracije ekstrakta komine masline udio manjih čestica smanjuje, a udio većih raste tj. udio čestica veličine od oko 215 nm smanjuje se na račun nastanka čestica veličine iznad 450 nm. Pretpostavlja se da se povećanjem koncentracije polifenola oni dodatno „lijepe“ na površinu nanočestica i tvore tu dodatnu frakciju većih nanočestica. Takav ishod je nepoželjan. Cilj je sintetizirati nanočestice jednolične veličine. Iz tog razloga za karakterizaciju sintetiziranih nanočestica selena značajni su rezultati uzoraka s koncentracijama EM 0,345 i 0,862 g/L. Slični rezultati dobiveni su korištenjem ekstrakta lista biljne vrste *Terminalia arjuna*, čije su komponente uz bioreduktivna svojstva pokazale i sposobnost oblaganja i stabilizacije nastalih SeNČ. Sintetizirane su polidisperzne čestice raspona veličine 10-80 nm koje se mogu usporediti s manjom frakcijom SeNČ dobivenih u ovom istraživanju (Prasad i Selvaraj, 2014). Nešto veće nanočestice

sintetizirane su korištenjem ekstrakta sjemenki piskavice (*Trigonella foenum – graecum*). Dobivene čestice bile su prosječne veličine 50-150 nm (Chandramohan i sur., 2018). Usporedbom tih vrijednosti zaključuje se da se biogenom sintezom uz pomoć biljnih ekstrakata kao reducirajućih i stabilizirajućih sredstava, često oblikuju nanočestice nejednolike veličine.

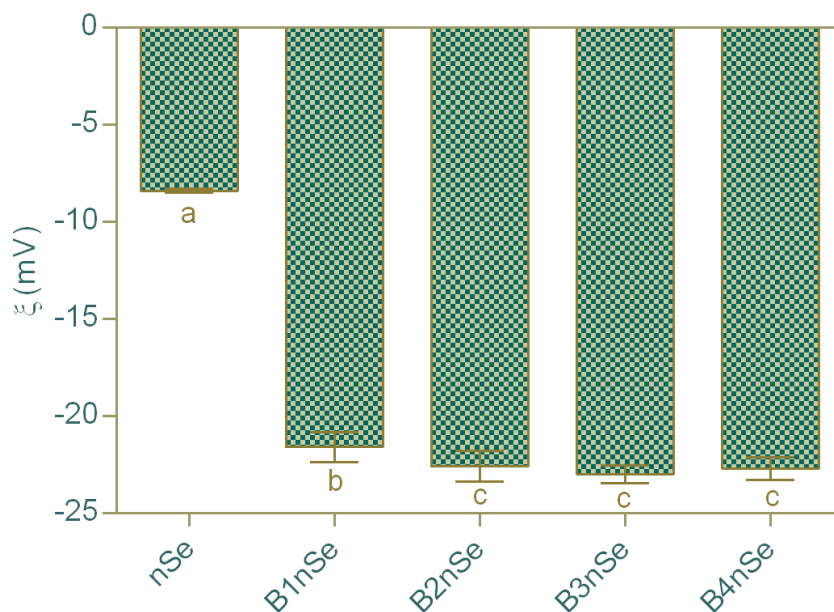
Stabilnost sintetiziranih nanočestica istražena je skladištenjem uzoraka na sobnoj temperaturi. Mjerenja su ponovljena za svaki uzorak 48 i 96h nakon sinteze te je praćena promjena veličine čestica (Slika 17). U uzorku bnSe1 skladištenjem se promjer čestica veće frakcije smanjuje, a promjer čestica manje frakcije raste. U uzorku bnSe2 skladištenjem se povećava promjer obje frakcije čestica, a nakon 96h se stvara i treća frakcija. Kod uzoraka bnSe3 i bnSe4 također su zabilježene oscilacije u veličini nanočestica, posebice u uzorku bnSe4 gdje se pojavljuje i četvrta frakcija. Iz navedenoga se zaključuje da se skladištenjem uzoraka promjer nanočestica selena mijenja, a novosintetizirane čestice pokazuju određeni stupanj nestabilnosti i tendenciju stvaranja novih frakcija čestica koje uglavnom nastaju aglomeriranjem postojećih nanočestica pri čemu nastaju čestice veličine 400-520 nm. Nastajanje većih aglomerata u promatranim sustavima nije zabilježeno. Suprotno tome, vrlo stabilne SeNČ jednolike veličine (~104,5 nm) dobivene su korištenjem ekstrakta ploda biljne vrste *Rosa roxburghii*. Novootkriveni polisaharid iz ekstrakta tog ploda, RTFP-3 zbog velikog elektrostatskog odbijanja pokazao je odličnu ulogu u oblaganju selenove jezgre i osiguravanju stabilnosti nanočestica ( $\zeta = -40,4$  mV). Međutim pozitivna svojstva uočena su tek kod koncentracije RTFP-3 od 2 mg/mL. Veličina čestica se povećanjem koncentracije sve do navedene vrijednosti smanjivala, nakon čega je tendencija smanjivanja stala. Također, čestice sintetizirane s 1 mg/mL RTFP-3 tijekom perioda skladištenja od 30 dana pokazale su linearno povećanje u veličini, dok su one sintetizirane s 2 mg/mL RTFP-3 pokazale iznimnu stabilnost tj. minimalnu promjenu u veličini (Wang i sur., 2019). Usporedbom dobivenih i rezultata ostalih istraživanja može se zaključiti da je u mjerenju stabilnosti nanočestica od iznimne važnosti raspolaganje s uzorcima različitih koncentracija upotrebljenog biljnog ekstrakta kako bi se utvrdila optimalna koncentracija oblagajućeg i stabilizirajućeg agensa za zadovoljavajući ishod istraživanja.



**Slika 17.** Veličina nanočestica selena 0, 48 i 96 h nakon sinteze

## 4.2. Zeta potencijal biogeno sintetiziranih nanočestica selena

Analizom rezultata mjerenja zeta potencijala utvrđeno je da primjena EM kao sredstva za oblaganje rezultira značajnim porastom apsolutnih vrijednosti zeta potencijala u odnosu na kontrolni uzorak. Naime, vrijednosti zeta potencijala biogeno sintetiziranih selenovih nanočestica u odnosu na vrijednosti zeta potencijala kemijski sintetiziranih nanočestica gotovo su se utrostručile, što se pokazalo kao velika prednost primijenjenog postupka. Prema smjericama o klasifikaciji nanočestica prema stabilnosti obzirom na zeta potencijal kao kriterij, sintetizirane nanočestice možemo okarakterizirati kao umjereno stabilne (Bhattacharjee, 2016). Slične vrijednosti zeta potencijala dobivene su i u drugim istraživanjima u kojima su pri sintezi selenovih nanočestica korišteni razni biljni produkti, npr. ekstrakt korijena astragalusa (*Astragalus membranaceus*) (-20,39 mV) (Meng i sur., 2018), ekstrakt sjemenki kakaovca (*Theobroma Cacao*) (cca -20 mV) (Mellinas i sur., 2019), ekstrakt ploda azijskog gloga (*Crataegus hupehensis*) (-24,5 mV) (Cui i sur., 2018) i dr. Iz grafičkog prikaza rezultata (Slika 18) vidljivo je da povećanjem koncentracije EM korištenog u sintezi blago raste i zeta potencijal nastalih nanočestica. Takav trend uočljiv je do koncentracije korištenog ekstrakta od 0.862 g/L (bnSe<sub>2</sub>) nakon čega se zeta potencijal više ne mijenja, neovisno o koncentraciji EM u reakcijskoj smjesi. Navedena koncentracija upotrebljenog ekstrakta pokazuje se dakle kao najpogodnija koncentracija za daljnja istraživanja, barem što se tiče stabilnosti sintetiziranih nanočestica.



**Slika 18.** Zeta potencijal analiziranih uzoraka

*Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )*

### 4.3. ABTS antioksidacijska aktivnost biogeno sintetiziranih nanočestica selena

Postotak gašenja apsorbancije (I%) izračunat je prema ranije navedenoj formuli za svaki od sedam uzoraka mjerenih u četveroplikatu. Vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzoraka izračunate su iz pripadajućeg baždarnog dijagrama ovisnosti smanjenja apsorbancije ABTS radikala o koncentraciji Trolox®-a te izražene kao ekvivalenti Trolox®-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost antioksidacijskih potencijala uzoraka koji sadrže istu koncentraciju ekstrakta komine masline (Tablica 3). Izračunate vrijednosti antioksidacijskog potencijala uzoraka su izvan mjernog područja baždarnog dijagrama zbog nužnog razrijeđenja otopine sintetiziranog nanoselena prije dodavanja u smjesu za mjerenje. Empirijski je kao najprikladnije razrijeđenje otopine sintetiziranog nanoselena svih četiriju koncentracija ekstrakta određeno peterostruko razrijeđenje. Krajnje vrijednosti ekvivalenata Trolox®-a su dobivene množenjem vrijednosti izračunatih iz jednadžbe pravca s brojem pet.

**Tablica 3.** Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala TEAC metodom

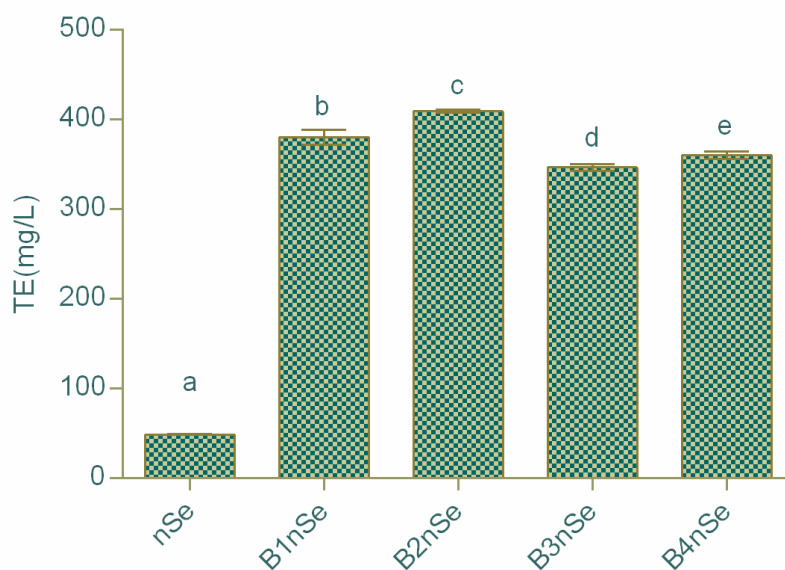
	TE* mg/L	St.dev
<b>nSe</b> (PVP)	48,68	0,4
<b>bnSe1</b> (0,345 g/L)	380,0	8,2
<b>bnSe2</b> (0,862 g/L)	409,0	1,5
<b>bnSe3</b> (1,724 g/L)	346,5	3,6
<b>bnSe4</b> (2,414 g/L)	360,1	4,4

\*TE-ekvivalenti Trolox-a®

Nanočestice selena sintetizirane korištenjem EM (*bnSe*) pokazuju daleko veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kemijski sintetizirane nanočestice (*nSe*). Takvi rezultati idu u prilog pretpostavkama o postizanju sinergističkog djelovanja selena i biološki aktivnih polifenola komine masline koji se „lijepe“ na elementarni selen. Selen kao sastavni dio enzima glutathion peroksidaze i tioredoksin reduktaze (Guillin i sur., 2019) djeluje posredno antioksidativno, dok polifenoli masline neutralizirajući slobodne radikale imaju direktan antioksidativni učinak (Gorzynik-Debicka i sur., 2018). Iz grafičkog prikaza rezultata (Slika 19) može se vidjeti da najveću aktivnost pokazuju uzorci bnSe1 i bnSe2 u kojem je korišten ekstrakt koncentracije 0,345 i 0,862 g/L. Pokazalo se da veće koncentracije upotrebljenog ekstrakta ne utječu na daljnje povećanje antioksidacijskog potencijala. Pretpostavka je da daljnjim povećanjem koncentracije ekstrakta tj. polifenola komine masline oni više nemaju tendenciju vezanja za površinu nanočestica i usporedno s tim nemaju utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Nadalje, kao razlog lošijeg slaganja dobivenih rezultata prvih dvaju uzoraka s očekivanim u smislu povezanosti koncentracije i antioksidacijske aktivnosti, može se navesti postupak odvajanja čistih selenovih nanočestica od ostatka reakcijske otopine. Korišteni postupak nije uključivao upotrebu ultracentrifuge ili dijalize, već obično centrifugiranje. Iz tog razloga postoji mogućnost da je prilikom odvajanja supernatanta i završnog dekantiranja dio čistih selenovih nanočestica izgubljen zbog nepotpune sedimentacije. Također postoji mogućnost da je talog u nekim uzorcima lošije ispran ostavljajući mogućnost zaostatka polifenola iz supernatanta. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima sličnih istraživanja drugih autora. Veliki postotak gašenja apsorbancije ABTS<sup>•+</sup> kation radikala ovisan o dozi uočen je analizom SeNČ dobivenih



redukcijom  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  korištenjem ekstrakta listova zelenog čaja uz polisaharide ploda običnog vučca (*Lycium barbarum*) kao sredstva za oblaganje. Kao uzrok navode se fenolne skupine antioksidativnih spojeva iz ekstrakta zelenog čaja (Zhang i sur., 2017). Nadalje, visok sadržaj fenola, flavonoida i trijeslovina na površini nanočestica istaknut je kao razlog za veliku sposobnost gašenja slobodnih radikala SeNČ sintetiziranih korištenjem ekstrakta ploda biljne vrste *Embllica officinalis* (Gunti i sur., 2019).



**Slika 19.** TEAC antiradikalna učinkovitost uzoraka

Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

#### 4.4. Ukupni redukcijski potencijal biogeno sintetiziranih nanočestica selen

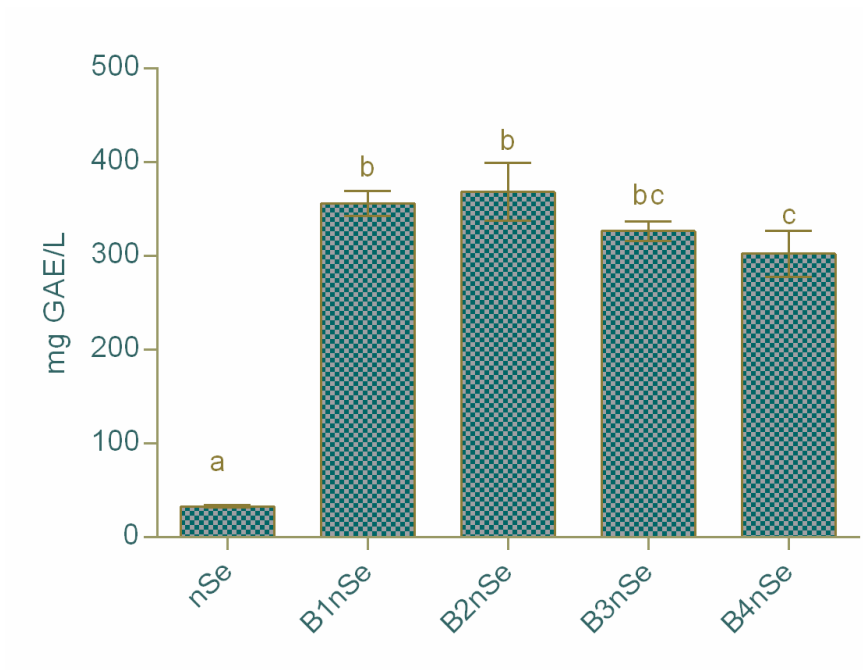
Ukupni redukcijski potencijal uzoraka određen je prema Folin-Ciocalteu metodi, a rezultati su pomoću pripadajućeg baždarnog dijagrama s galnom kiselinom, izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) (Tablica 4). Empirijski je kao najpogodnije za mjerenje određeno peterostruko razrijeđenje.

**Tablica 4.** Rezultati određivanja ukupnog reduksijskog potencijala uzoraka Folin-Ciocalteu metodom

	GAE* mg/L	St.dev
<b>nSe</b> (PVP)	32,7	1,4
<b>bnSe1</b> (0,345 g/L)	356,1	13,4
<b>bnSe2</b> (0,862 g/L)	368,3	30,7
<b>bnSe3</b> (1,724 g/L)	326,3	10,7
<b>bnSe4</b> (2,414 g/L)	302,1	24,7

\*GAE-ekvivalenti galne kiseline

Najveći reduksijski potencijal pokazali su uzorci bnSe1 i bnSe2. Ti rezultati su u korelaciji s rezultatima antiradikalne učinkovitosti analiziranih uzoraka. Iz navedenog se može zaključiti da su se koncentracije korištenog ekstrakta komine masline od 0,345 i 0,862 g/L istakle kao najbolje polazne koncentracije za daljnja ispitivanja i optimiranja postupka sinteze. Iz grafičkog prikaza (Slika 20) vidljivo je da daljnjim povećanjem koncentracije ekstrakta u sintezi, ukupni reduksijski potencijal nanočestica više ne raste. Takva pojava u skladu je s rezultatima mjerenja antiradikalne aktivnosti te ide u prilog pretpostavci da porastom koncentracije polifenola u reakcijskoj smjesi iznad granične dolazi do prestanka njihovog vezanja na selenovu jezgru, a time i ograničenja u daljnjem povećanju reduksijskih svojstava nanočestica. S obzirom da je u sintezi korištena askorbinska kiselina koja je uz reducirajuće šećere najčešća interferirajuća komponenta u Folin-Ciocalteu reakciji, konačne rezultate reduksijskih potencijala treba protumačiti s oprezom (George i sur., 2005). Askorbinska kiselina normalno reagira s Folin-Ciocalteu reagensom u kiselim uvjetima (pH~3) prije dodatka alkalnog agensa i potiče nastajanje plavog obojenja čija se apsorbancija kasnije mjeri. Dodatno plavo obojenje uzrokovano reakcijom s askorbatom, najčešće je nepoželjno i može dati veće vrijednosti apsorbancije tj. veće vrijednosti reduksijskog potencijala. Iz tog razloga razvijene su razne korektivne metode gdje se prije dodatka alkalija mjeri obojenje uzrokovano askorbinskom kiselinom, a zatim se ta vrijednost oduzima od ukupne apsorbancije na kraju reakcije (Singleton i sur, 1999). Time se dobije stvarna vrijednost reduksijskog potencijala uzorka. Tijekom provođenja eksperimenta nije primjećena pojava plave boje reakcijske smjese prije dodatka lužine što znači da je nSe adekvatno pročišćen prije mjerenja antioksidativne aktivnosti.



**Slika 20.** Reduktivni potencijal analiziranih uzoraka

*Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )*

## 5. ZAKLJUČCI

- Korištenjem ekstrakta komine masline, biogenom sintezom uspješno su sintetizirane dvije značajne frakcije SeNČ prosječne veličine 35 i 215 nm koje u testovima stabilnosti skladištenjem pokazuju određen stupanj nestabilnosti.
- Polifenoli ekstrakta komine masline zaslužni su za dobre vrijednosti zeta potencijala nastalih SeNČ (cca -22,5 mV). Negativan naboj na površini nanočestica uzrokuje njihovo elektrostatičko odbijanje što uvelike pridonosi stabilizaciji nastalog nanosustava.
- Porast apsolutnih vrijednosti zeta potencijala proporcionalan je koncentraciji EM u reakcijskoj smjesi, ali do koncentracije 0.862 g/L. Daljnji porast koncentracije EM ne utječe značajno na zeta potencijal nastalih nano čestica.
- Za razliku od kemijski sintetiziranih SeNČ pomoću polivinilpirolidona, SeNČ dobivene korištenjem EM pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost u smislu izravnog gašenja slobodnih radikala. Najbolji učinak pokazuje koncentracija korištenog EM od 0,862 g/L.
- Vrijednosti antioksidacijskog potencijala i ukupnog reduksijskog potencijala SeNČ rastu povećanjem koncentracije upotrebljenog EM sve do koncentracije EM od 0,862 g/L. Daljnje povećanje koncentracije nema utjecaj na dodatan porast tih vrijednosti.
- Rezultati antioksidacijskih ispitivanja u ovom radu potvrdili su hipotezu potencijalnog sinergističkog antioksidativnog djelovanja polifenola masline i Se u biogeno sintetiziranim nanočesticama Se.
- Razvoj metode sinteze SeNČ korištenjem ekstrakta komine masline predstavlja značajan doprinos pronalaženju održivih načina iskorištavanja prehrambenog otpada za dobivanje nutritivno vrijednih i biološki aktivnih sastavnica s potencijalno značajnim učincima na zdravlje.

## 6. LITERATURA

Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2007, 2, 875–877.

Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor. *Food Chem*, 2011, 128, 704–710.

Arif A, Bhatti A, John P. Therapeutic potential of *Foeniculum vulgare* mill. Derived selenium nanoparticles in arthritic Balb/c mice. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14, 8561–8572.

Ávila FW, Yang Y, Faquin V, Ramos SJ, Guilherme LRG, Thannhauser TW, Li L. Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified *Brassica* sprouts. *Food Chem*, 2014, 165, 578–586.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, 2016, 235, 337–351.

Čepo DV, Radić K, Jurmanović S, Jug M, Rajković MG, Pedisić S, Moslavac T, Albahari P. Valorization of olive pomace-based nutraceuticals as antioxidants in chemical, food, and biological models. *Molecules*, 2018, 23, 1–22.

Chandramohan S, Sundar K, Muthukumaran A. A Novel Hollow Selenium Nanoparticles (hSeNPs) From Potato Extract and Investigation of its Biological Properties and Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos. *IET Nanobiotechnology*, 2018, 1–12.

Chang JC, Gutenmann WH, Reid CM, Lisk DJ. Selenium Content of Brazil Nuts from Two Geographic Locations in Brazil. *Chemosphere*, 1995, 30, 801–802.

Chen J. An original discovery: Selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). *Asia Pac J Clin Nutr*, 2012, 21, 320–326.

Chin K, Ima-Nirwana S. Olives and Bone : A Green Osteoporosis Prevention Option. *Int J Environ Res Public Heal Rev*, 2016, 13, 1–11.

Cihalova K, Chudobova D, Michalek P, Moulick A. Staphylococcus aureus and MRSA Growth and Biofilm Formation after Treatment with Antibiotics and SeNPs. *Int J Mol Sci*, 2015, 16, 24656–24672.

Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem*, 2010, 121, 105–111.

Cui D, Liang Tingting, Sun L, Meng L, Yang C, Wang L, Liang Taigang, Li Q. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharm Biol*, 2018, 56, 528–534.

Davis CD. Selenium Supplementation and Cancer Prevention. *Curr Nutr Rep*, 2012, 1, 16–23.  
De Bruno A, Romeo R, Fedele FL, Sicari A, Piscopo A, Poiana M. Antioxidant activity shown by olive pomace extracts. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes*, 2018, 53, 526–533.

Dennert G, Zwahlen M, Brinkman M, Vinceti M, Mpa Z, Horneber M. Selenium for preventing cancer ( Review ). *TheCochrane Libr 2011*, 2012, 1–134.

Dodig S, Čepelak I. The facts and controversies about selenium. *Acta Pharm*, 2004, 54, 261–276.

Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Hydroxytyrosol and cytoprotection: A projection for clinical interventions. *Int J Mol Sci*, 2017, 18, 1–14.

Gao F, Yuan Q, Gao L, Cai P, Zhu H, Liu R, Wang Y, Wei Y, Huang G, Liang J, Gao X. Biomaterials Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*, 2014, 35, 8854–8866.

George S, Brat P, Alter P, J.Amot M. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 1370–1373.

Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling †. *Endocr Rev*, 2008, 29, 898–938.

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Gammazza AM, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 1–13.

Guillin OM, Vindry C, Ohlmann T, Chavatte L. Selenium, selenoproteins and viral infection, *Nutrients*. 2019.

Gunti L, Dass RS, Kalagatur NK. Phytofabrication of selenium nanoparticles from *Emblica officinalis* fruit extract and exploring its biopotential applications: Antioxidant, antimicrobial, and biocompatibility. *Front Microbiol*, 2019, 10, 1–17.

Hariharan H, Karuppiyah P, Rajaram SK. Microbial synthesis of selenium nanocomposite using *Saccharomyces cerevisiae* and its antimicrobial activity against pathogens causing nosocomial infection. *Chalcogenide Lett*, 2012, 9, 509–515.

Hartikainen H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol*, 2005, 18, 309–318.

Huang Y, He L, Liu W, Fan C, Zheng W, Wong Y, Chen T. Biomaterials Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*, 2013, 34, 7106–7116.

Husen A, Siddiqi KS. Plants and microbes assisted selenium nanoparticles: Characterization and application. *J Nanobiotechnology*, 2014, 12, 1–10.

Ingale AG, Chaudhari AN. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: An eco-friendly approach. *J Nanomedicine Nanotechnol*, 2013, 4, 1–7.

Ip C, Hayes C, Marie Budnick R. Chemical Form of Selenium, Critical Metabolites, and Cancer Prevention. *Cancer Res*, 1991, 51, 595–600.

Kantoci D, Maslina. *Glas zaštite bilja*, 2006, 29, 4–14.

Khurana A, Tekula S, Aslam M, Venkatesh P, Godugu C. Biomedicine & Pharmacotherapy Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111, 802–812.

Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev*, 2014, 94, 739–777.

Liu W, Li X, Wong Y, Zheng W, Zhang Y, Cao W. Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5 - Fluorouracil to Achieve Anticancer. *Am Chem Soc*, 2012, 6, 6578–6591.

Maguire CM, Rösslein M, Wick P, Prina-Mello A. Characterisation of particles in solution—a perspective on light scattering and comparative technologies. *Sci Technol Adv Mater*, 2018, 19, 732–745.

Maiyo F, Singh M. Selenium nanoparticles: Potential in cancer gene and drug delivery. *Nanomedicine*, 2017, 12, 1075–1089.

Mellinas C, Jiménez A, Del Carmen Garrigós M. Microwave-assisted green synthesis and antioxidant activity of selenium nanoparticles using *Theobroma cacao* L. bean shell extract. *Molecules*, 2019, 24, 1–20.

Meng Y, Zhang Y, Jia N, Qiao H, Zhu M, Meng Q, Lu Q, Zu Y. Synthesis and evaluation of a novel water-soluble high Se-enriched *Astragalus* polysaccharide nanoparticles. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118, 1438–1448.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 1993, 84, 407–412.

Nogueira JH. Valorization of olive pomace through combination of biocatalysis with supercritical fluid technology. *Univ Nov Lisboa*, 2015, 1–99.



Nothstein AK, Eiche E, Riemann M, Nick P, Winkel LHE, Göttlicher J, Steininger R, Brendel R, Von Brasch M, Konrad G, Neumann T. Tracking Se assimilation and speciation through the rice plant - Nutrient competition, toxicity and distribution. *PLoS One*, 2016, 11, 1–15.

Obied HK, Prenzler PD, Omar SH, Ismael R, Servili M, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S. Pharmacology of olive biophenols, *Advances in Molecular Toxicology*. Elsevier B.V., 2012.

Oliviero F, Scanu A, Zamudio-cuevas Y, Punzi L, Spinella P. Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *J Sci FoodAgric*, 2017, 1–7.

Pilon-Smits EA, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M. Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12, 267–274.

Prasad KS, Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on as(III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 157, 275–283.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 4290–4302.

Rayman MP, Infante HG, Sargent M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. *Br J Nutr*, 2008, 100, 238–253.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Evans CR-. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 1231–1237.

Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 2014, 6, 25–54.

Salopek B, Krasić D, Filipović S. Measurement and application of zeta-potential. *Rud Zb*, 1992, 4, 147–151.

Schrauzer GN. Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety. *Pure Appl Chem*,

2006, 78, 105–109.

Sharma G, Sharma AR, Bhavesh R, Park J, Ganbold B, Nam JS, Lee SS. Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried vitis vinifera (raisin) extract. *Molecules*, 2014, 19, 2761–2770.

Shoeibi S, Mozdziak P, Golkar-Narenji A. Biogenesis of Selenium Nanoparticles Using Green Chemistry. *Top Curr Chem*, 2017, 375, 1–21.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999, 299, 152–178.

Skalickova S, Milosavljevic V, Cihalova K, Horiky P, Richtera L, Adam V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, 2017, 33, 83–90.

Soto-Alarcon SA, Valenzuela R, Valenzuela A, Videla LA. Liver Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil: Interaction between Its Chemical Composition and the Cell-signaling Pathways Involved in Protection. *Bentham Sci*, 2017, 18, 75–84.

Tareq FK, Fayzunnesa M, Kabir MS, Nuzat M. Mechanism of bio molecule stabilized selenium nanoparticles against oxidation process and Clostridium Botulinum. *Microb Pathog*, 2018, 115, 68–73.

Tran AP, Webster JT. Selenium nanoparticles inhibit Staphylococcus aureus growth. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6, 1553–1558.

Vendeland SC, Deagen JT, Butler JA, Whanger PD. Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biometals*, 1994, 7, 305–312.

Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles : current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechno*, 2016, 1–12.

Wang L, Li C, Huang Q, Fu X. Biofunctionalization of selenium nanoparticles with a polysaccharide from: *Rosa roxburghii* fruit and their protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in INS-1 cells. *Food Funct*, 2019, 10, 539–553.

White PJ, Broadley MR. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine Philip. *New Phytol*, 2009, 182, 49–84.

Yang R, Liu Y, Zhou Z. Selenium and selenoproteins, from structure, function to food resource and nutrition. *Food Sci Technol Res*, 2017, 23, 363–373.

Zhang Wenjing, Zhang J, Ding D, Zhang L, Muehlmann LA, Deng S e., Wang X, Li W, Zhang Weifen. Synthesis and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides capped selenium nanoparticles using tea extract. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*, 2017, 46, 1463–1470.

## 7. SAŽETAK

Prilikom procesa proizvodnje maslinovog ulja kao nusprodukt nastaju velike količine čvrstog ostatka koji se naziva komina masline. Ona je bogata polifenolima, spojevima koji imaju dokazano antioksidacijsko djelovanje. Cilj ovog rada bio je razviti proces biogene sinteze nanočestica selena korištenjem ekstrakta komine masline kao prirodnog sredstva za oblaganje koje će potencijalno sa selenom ostvarivati i sinergističko antioksidativno djelovanje. Selen kao sastavni dio enzima glutation peroksidaze djeluje posredno antioksidativno, dok polifenoli imaju izravan učinak na gašenje slobodnih radikala, jaki su reducenski te keliraju metale. Provedena je optimirana sinteza nanočestica selena s obzirom na koncentraciju EM te je DLS analizom ispitana raspodjela veličine čestica, stabilnost i zeta potencijal. Antioksidacijski potencijal ispitana je ABTS i Folin-Ciocalteu metodama. Kao pozitivna kontrola sintetskog procesa korištena je kemijska sinteza SeNČ korištenjem polivinilpirolidona. Biogenom sintezom uspješno su sintetizirane dvije značajne frakcije SeNČ prosječne veličine 35 i 215 nm koje u testovima stabilnosti skladištenjem pokazuju određen stupanj nestabilnosti. Analizom rezultata zeta potencijala utvrđeno je da je elektrostatsko odbijanje između sintetiziranih SeNČ vrlo dobro (cca -22,5 mV). Za razliku od kemijski sintetiziranih SeNČ, biogeno sintetizirane SeNČ pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost u smislu izravnog gašenja slobodnih radikala te ukupnog redukcijskog potencijala. Najbolje rezultate pokazao je uzorak koncentracije EM 0,862 g/L. Povećanje koncentracije EM iznad 0,862 g/L nema utjecaj na dodatan porast antioksidacijskog potencijala SeNČ. Rezultati ovog rada značajno doprinose razvoju saznanja o mogućnostima korištenja ekstrakta komine masline u razvoju nanonutraceutika točnije, mogućnostima primjene spomenutih ekstrakata kao prirodnih funkcionalnih sredstava za oblaganje metalnih nanočestica.

## SUMMARY

During the olive oil production process, large amounts of a solid residue called olive pomace is produced. It is rich in polyphenols, compounds with proven antioxidant activity. The aim of this research was to develop the process of biogenic synthesis of selenium nanoparticles using olive pomace extract (OPE) as a natural coating agent that will potentially have a synergistic antioxidant effect with selenium. Selenium as the component of glutathione peroxidase has an indirect antioxidant effect, while polyphenols have a direct effect on scavenging free radicals, are strong reducing agents and chelate metals. Optimized synthesis of SeNPs has been conducted using different concentrations of OPE. Nanoparticle size distribution, stability and zeta potential was determined by DLS analysis. Antioxidant activity was examined by ABTS and Folin-Ciocalteu methods. Chemical synthesis of SeNPs using polyvinylpyrrolidone was used as a positive control of the synthetic process.. Two significant fractions of SeNPs with an average size of 35 and 215 nm were successfully synthesized by biogenic synthesis, which showed a certain degree of instability in storage stability tests. Analysis of zeta potential showed that the electrostatic repulsion between the synthesized SeNPs was satisfying (approx. -22,5 mV). Unlike chemically synthesized SeNPs, biogenically synthesized SeNPs show significant antioxidant activity in terms of direct scavenging of free radicals and overall reduction potential. The best results were obtained for the sample prepared with 0.862 g/L OPE while further increase of OPE concentration (above 0.862 g/L) had no effect on antioxidant potential of SeNPs. The results of this research significantly contribute to current knowledge on possibilities of using olive pomace extract in the development of nanonutraceuticals, more precisely, the possibilities of using these extracts as natural functional coating agents in formulation of metal nanoparticles.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## BIOGENA SINTEZA NANOČESTICA SELENA KORIŠTENJEM EKSTRAKTA KOMINE MASLINE

Roko Mandac

### SAŽETAK

Prilikom procesa proizvodnje maslinovog ulja kao nusprodukt nastaju velike količine čvrstog ostatka koji se naziva komina masline. Ona je bogata polifenolima, spojevima koji imaju dokazano antioksidacijsko djelovanje. Cilj ovog rada bio je razviti proces biogene sinteze nanočestica seleno korištenjem ekstrakta komine masline kao prirodnog sredstva za oblaganje koje će potencijalno sa selenom ostvarivati i sinergističko antioksidativno djelovanje. Selen kao sastavni dio enzima glutation peroksidaze djeluje posredno antioksidativno, dok polifenoli imaju izravan učinak na gašenje slobodnih radikala, jaki su reducenski te keliraju metale. Provedena je optimirana sinteza nanočestica seleno s obzirom na koncentraciju EM te je DLS analizom ispitana raspodjela veličine čestica, stabilnost i zeta potencijal. Antioksidacijski potencijal ispitano je ABTS i Folin-Ciocalteu metodama. Kao pozitivna kontrola sintetskog procesa korištena je kemijska sinteza SeNČ korištenjem polivinilpirolidona. Biogenom sintezom uspješno su sintetizirane dvije značajne frakcije SeNČ prosječne veličine 35 i 215 nm koje u testovima stabilnosti skladištenjem pokazuju određen stupanj nestabilnosti. Analizom rezultata zeta potencijala utvrđeno je da je elektrostatsko odbijanje između sintetiziranih SeNČ vrlo dobro (cca -22,5 mV). Za razliku od kemijski sintetiziranih SeNČ, biogeno sintetizirane SeNČ pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost u smislu izravnog gašenja slobodnih radikala te ukupnog redukcijskog potencijala. Najbolje rezultate pokazao je uzorak koncentracije EM 0,862 g/L. Povećanje koncentracije EM iznad 0,862 g/L nema utjecaj na dodatan porast antioksidacijskog potencijala SeNČ. Rezultati ovog rada značajno doprinose razvoju saznanja o mogućnostima korištenja ekstrakta komine masline u razvoju nanonutraceutika točnije, mogućnostima primjene spomenutih ekstrakata kao prirodnih funkcionalnih sredstava za oblaganje metalnih nanočestica.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 20 grafičkih prikaza, 4 tablice i 62 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, polifenoli, selen, nanočestice, antioksidacijski potencijal, stabilnost

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Mario Jug**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of nutritional chemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **BIOGENIC SYNTHESIS OF SELENIUM NANOPARTICLES USING OLIVE POMACE EXTRACT**

**Roko Mandac**

#### **SUMMARY**

During the olive oil production process, large amounts of a solid residue called olive pomace is produced. It is rich in polyphenols, compounds with proven antioxidant activity. The aim of this research was to develop the process of biogenic synthesis of selenium nanoparticles using olive pomace extract (OPE) as a natural coating agent that will potentially have a synergistic antioxidant effect with selenium. Selenium as the component of glutathione peroxidase has an indirect antioxidant effect, while polyphenols have a direct effect on scavenging free radicals, are strong reducing agents and chelate metals. Optimized synthesis of SeNPs has been conducted using different concentrations of OPE. Nanoparticle size distribution, stability and zeta potential was determined by DLS analysis. Antioxidant activity was examined by ABTS and Folin-Ciocalteu methods. Chemical synthesis of SeNPs using polyvinylpyrrolidone was used as a positive control of the synthetic process.. Two significant fractions of SeNPs with an average size of 35 and 215 nm were successfully synthesized by biogenic synthesis, which showed a certain degree of instability in storage stability tests. Analysis of zeta potential showed that the electrostatic repulsion between the synthesized SeNPs was satisfying (approx. -22,5 mV). Unlike chemically synthesized SeNPs, biogenically synthesized SeNPs show significant antioxidant activity in terms of direct scavenging of free radicals and overall reduction potential. The best results were obtained for the sample prepared with 0.862 g/L OPE while further increase of OPE concentration (above 0.862 g/L) had no effect on antioxidant potential of SeNPs. The results of this research significantly contribute to current knowledge on possibilities of using olive pomace extract in the development of nanonutraceuticals, more precisely, the possibilities of using these extracts as natural functional coating agents in formulation of metal nanoparticles.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 20 figures, 4 tables and 62 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, polyphenols, selenium, nanoparticles, antioxidant potential, stability

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Jug, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.

