

# Mogućnosti primjene ekstrakta komine masline u sintezi nanoselena

---

Schauperl, Laura

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:163:179892>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Laura Schauperl**

**Mogućnosti primjene ekstrakta komine masline u  
sintezi nanoselena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020. godina.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom 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, prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo, na stručnom i strpljivom vodstvu kroz izradu i pisanje rada, prenesenom znanju te motiviranju i poticanju interesa za područje Biokemije prehrane. Također, zahvaljujem asistentici, Kristini Radić, mag. pharm., na korisnim savjetima i pomoći pri izvođenju rada.*

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Nanoselen .....	1
1.2. Komina masline .....	2
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	4
3. MATERIJALI I METODE .....	5
3.1. Materijali .....	5
3.1.1. Korištene kemikalije .....	5
3.1.2. Korišteni instrumenti i oprema .....	5
3.1.3. Priprema suhog ekstrakta komine masline .....	6
3.1.4. Sinteza selenovih nanočestica .....	6
3.1.5. Priprema slijepih proba .....	9
3.2. Metode .....	10
3.2.1. Mjerenje raspodjele veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS) ...	10
3.2.2. Mjerenje zeta potencijala .....	11
3.2.3. Mjerenje redukcijskog potencijala nanočestica Folin-Ciocalteu metodom .....	12
3.2.4. Mjerenje antiradikalne aktivnosti nanočestica TEAC ( <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> ) metodom .....	14
3.2.5. Mjerenje antiradikalne učinkovitosti nanočestica ORAC ( <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> ) metodom .....	17
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Raspodjela veličine čestica .....	21
4.2. Rezultati ispitivanja zeta potencijala .....	25
4.3. Reduktivna sposobnost nanoselena .....	28
4.4. Antiradikalna učinkovitost uzoraka .....	31
5. ZAKLJUČCI .....	35
6. LITERATURA .....	36
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	40
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1. Nanoselen

Selen (Se) je esencijalan element koji se u ljudskom organizmu nalazi u tragovima. Ključan je za funkcioniranje selenoproteina koji sudjeluju u regulaciji brojnih procesa u organizmu, a osobito su važni za obranu organizma od oksidacijskog stresa. Osim antioksidativnog, selen ima i imunomodulatorno djelovanje, smanjuje resorpciju kosti i regulira funkciju štitnjače (Majeed i sur., 2018). Selen je u obliku selenocisteina nužan za adekvatnu ekspresiju i aktivnost glutation peroksidaza, koje reduciraju vodikov peroksid i ostale organske perokside te tioreduksin reduktaza, koje su ključni elementi glavnog unutarstaničnog redoks sustava (tioredoksin sustav) (Wee Tan i sur., 2019; Tinggi, 2008). Kao sastavni dio dejodinaza, selen sudjeluje i u hormonskoj regulaciji i održavanju metaboličke homeostaze organizma (Bećirović, 2018). Najčešći oblici selena u hrani su selenometionin, selenocistein, seleniti i selenati te metilirani oblici selena (Majeed i sur., 2018). Svi se oblici dobro apsorbiraju iz hrane (70 % - 95 %), s tim da je bioraspoloživost organskih oblika selena nešto bolja u odnosu na selenit i selenat. Za selen je karakterističan uzak raspon između preporučenog dnevnog unosa (55 µg) i podnošljive gornje razine unosa (400 µg), iznad koje se može očekivati pojava simptoma toksičnosti, koja se manifestira kao selenoza (gubitak i krhkost kose i noktiju, kožne lezije, neurološki simptomi) (Wee Tan i sur., 2019; Vyas i Rana, 2017).

Nanoselen se na tržištu nalazi ili u obliku anorganskih soli, selenita i selenata, ili kao organski selen (u preparatima je obično najzastupljeniji selenometionin, a nastaje procesom biogene sinteze u plijesnima). Relativno novi oblik selena koji se pojavio na tržištu je elementarni selen u obliku nanočestica (tzv. nanoselen-SeNP). Prema nekim autorima, nanoselen ima bolju bioraspoloživost, manje je toksičan, a biološki učinkovitiji od anorganskih oblika selena (Alam i sur., 2019; Hosnedlova i sur., 2018).

Postoje različite mogućnosti sinteze nanočestica selena, a u literaturi su dostupni opisi fizikalnih, kemijskih te biogenih sinteza. Kemijske sinteze, između ostalog, uključuju redukciju soli natrijeva selenita kemijskim reducensima, poput askorbinske kiseline. U biogenim se sintezama, s druge strane, za redukciju koriste prirodni izvori, poput mikroorganizama ili ekstrakta biljaka (Alam i sur., 2019). Potencijal primjene prirodnih sirovina u ovakvim sintezama postoji, između ostalog, i u zamjeni sintetskih materijala koji se inače koriste za oblaganje i stabiliziranje sintetiziranih nanočestica (Jain i sur., 2015). Zamjenom sintetskih kemikalija prirodnim sirovinama u biogenoj sintezi nanočestica selena, postiže se veća sigurnost medicinske primjene i smanjenje toksičnosti (Vyas i Rana, 2017).

## **1.2. Komina masline**

Maslina (*Olea Europea* L.) je mediteransko stablo iz porodice Oleaceae. Podrijetlom je iz Male Azije, a uzgaja se na Mediteranu, u Africi, Aziji te Južnoj Americi (Brlek Savić i sur., 2009). Postoji više podvrsta masline koje rastu na različitim područjima, a dominantna je kultivirana podvrsta koja se uzgaja u Europi, *Olea Europea* subsp. *Europaea*.

Plod masline je mesnata, jajasta koštunica. Dugačka je 1 cm - 3 cm, a široka do 2 cm (www.plantea.com). U početku je zelena, kasnije poprima crveniju boju, a dozrijevanjem u studenom i prosincu postaje još tamnija, poprimajući tamnoplavu, gotovo crnu boju. Dozrijevanjem plod gubi gorčinu, a povećava se sadržaj ulja, te se baš taj dozreli, tamniji plod bere za proizvodnju ulja (Maleš, 2014). Ulje se u plodu nalazi u pulpi u vakuolama stanica (Brlek Savić i sur., 2009).

Proces dobivanja maslinovog ulja iz ploda masline odvija se ili postupkom hladnog prešanja ili centrifugiranjem. I u jednom i u drugom procesu, uz maslinovo ulje, nastaju i nusprodukti: vegetabilna voda i komina. Komina se sastoji od vode i dijelova ploda masline: kožice, pulpe i samljevene koštice. To je tamna smjesa gumaste strukture, umjereno kiselog pH te intenzivnog mirisa. Na kemijski sastav komine utječe proces proizvodnje maslinovog ulja, kao i tip, stanje i porijeklo masline iz koje se proizvodi, no uglavnom se sastoji od vode, celuloze, bjelančevina, polifenola i ulja (Brlak Savić i sur., 2009).

Tijekom proizvodnje ulja nastaju velike količine komine, čije je zbrinjavanje zakonska obveza u Europskoj uniji, međutim, način tog zbrinjavanja nije reguliran. U Hrvatskoj je, u Pravilniku o ekološkoj proizvodnji u uzgoju bilja i u proizvodnji biljnih proizvoda (NN/91/2001), definirano da se otpad poljoprivredne proizvodnje ne može koristiti bez njegove određene obrade, što predstavlja ekonomski teret za proizvođača. Također, redovito nastajanje velikih količina komine predstavlja ekološki problem, zbog toga što se organski spojevi zaostali u komini razgrađuju do fitotoksičnih spojeva sa štetnim utjecajem na mikroorganizme u tlu i vodi.

Komina se može koristiti za proizvodnju energije te kao gnojivo i stočna hrana, no većina ostaje neiskorištena. Zbog organskih spojeva u svom sastavu, javlja se ideja iskorištavanja komine u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, a tome uvelike doprinosi antioksidacijski potencijal polifenolnih komponenti zaostalih u komini (Lafka i sur., 2011; Roig i sur., 2006).

Zbog svoje strukture, koju karakterizira aromatski prsten s minimalno jednom hidroksilnom skupinom, polifenoli imaju izraženu antioksidacijsku učinkovitost. Zahvaljujući hidroksilnoj skupini, mogu reducirati visoko reaktivne prooksidanse, odnosno slobodne radikale, uz nastanak netoksičnih i stabilnih produkata (Hussain i sur., 2016).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kemijska sinteza nanoselena podrazumijeva redukciju selenita ili selenata korištenjem reducensa, kao što je L-askorbinska kiselina te stabilizaciju nastalih čestica oblaganjem. Za oblaganje se najčešće koriste različiti sintetski polimeri, kao što je polivinilpirolidon (PVP), koji sterički onemogućuju aglomeraciju i taloženje elementarnog Se.

Opći cilj ovog rada bio je razviti proces biogene sinteze nanoselena, kojim bi se izbjegla primjena sintetskih sredstava za oblaganje, a za stabilizaciju nastalih nanočestica koristio bi se ekstrakt komine masline (EKM), koji bi, teoretski, putem elektrostatskih interakcija, onemogućio aglomeraciju Se i zadržao čestice u željenom nanorasponu veličina.

Razvoj takvog zelenog procesa sinteze nanoselena važan je:

- u kontekstu općeg trenda poboljšanja ekološke prihvatljivosti proizvodnih procesa, u smislu zamjene sintetskih obloga onim prirodnim, dobivenim iz otpada zelenim procesima ekstrakcije,
- za evaluaciju otpada hrane kao važnih sekundarnih sirovina i razvoja proizvoda s dodanom vrijednošću iz otpada hrane,
- zbog razvoja nutriceutika s poboljšanim biološkim učincima. Naime, ekstrakt komine masline posjeduje snažnu antioksidacijsku aktivnost, kao i Se. Međutim, antioksidacijsko djelovanje ekstrakta komine masline se temelji na potpuno drugačijem mehanizmu djelovanja: redukcijskoj učinkovitosti i sposobnosti hvatanja radikala. Zato bi uspješno uklapanje čestica nanoselena u oblogu ekstrakata komine masline moglo rezultirati stvaranjem nutriceutika poboljšane antioksidacijske učinkovitosti.

Stoga su specifični ciljevi ovog rada optimirati primjenu EKM u procesu biogene sinteze nanoselena kako bi se dobile čestice odgovarajuće raspodjele veličine i zadovoljavajućeg zeta potencijala te istražiti rezultira li korištenje EKM kao prirodnog sredstva za oblaganje poboljšanjem reduktivne i antiradikalne učinkovitosti nastalih nanočestica.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Korištene kemikalije i reagensi**

- Natrijev selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (0.1 M)
- L-askorbinska kiselina (L-ASK) (0.1 M)
- Polivinilpirolidon (PVP) (1%)
- Nativni suhi ekstrakt komine masline (EKM) (10 %)
- Deionizirana voda Millipore – MiliQ sistem za pročišćavanje vode
- Folin-Ciocalteu reagens
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Galna kiselina
- 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina - Trolox®
- 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) - ABTS
- Kalijev persulfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ )
- 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)-dihidroklorid - AAPH
- Sol natrijeva fluoresceina
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Kalijev hidrogenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- Natrijev hidroksid (NaOH)
- Klorovodična kiselina (HCl)

##### **3.1.2. Korišteni instrumenti i oprema**

- Analitička vaga (Mettler Toledo, Columbus, Ohio)
- Vortex aparat VTX-3000L (Mixer Uzusio, Tokio, Japan)
- Magnetska mješalica
- Čitač mikrotitarskih pločica Victor X3 (Perkin Elmer, Waltham, SAD)
- Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, UK)
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica
- Multikanalna pipeta (Mettler, Toledo, SAD)
- Mikropipete
- Eppendorf epruvete

- Falcon kivete
- Odmjerne tikvice
- Staklene čaše

Ispitivani materijali su 3 različita uzorka nastala sintezom nanočestica selena, redukcijom L-askorbinskom kiselinom (L-ASK) iz natrijeva selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Razlikuju se prema vrsti korištenih polimera za oblaganje. U uzorku 1 je za oblaganje korišten sintetski polimer polivinilpirolidon (PVP), a u uzorcima 2 i 3 je korišten ekstrakt komine masline (EKM). Uzorci 2 i 3 se međusobno razlikuju po volumnom udjelu EKM korištenim u postupku sinteze.

### 3.1.3. Priprema suhog ekstrakta komine masline

Komina masline bez koštica, nakon što je osušena i prosijana, ekstrahirana je sa 60 %-tnim etanolom (EtOH), u trajanju od 2 sata, na 70 °C, uz protresanje (100 rpm). Na rotavaporu je uklonjen etanol, a ostatak je liofiliziran. Time nastaje suhi ekstrakt koji je korišten za biogenu sintezu nanočestica selena.

### 3.1.4. Sinteza selenovih nanočestica

Sastav i količine reagenasa korištenih za kontrolnu, kemijsku (uzorak 1), i biogene sinteze (uzorci 2 i 3) nanoselena detaljno su prikazane u Tablici 1.

**Tablica 1.** Priprema reakcijskih smjesa za izradu uzoraka 1, 2 i 3.

Uzorak	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (0,1 M) /mL	L-ASK (0,1 M) /mL	EKM (10 %) /mL	PVP (1%) /mL	miliQ voda /mL
1	1	10	0	9	9
2	1	10	1	0	17
3	1	10	2	0	16

Za sintezu kontrolne otopine nanoselena u reakcijsku posudu dodano je 10 mL L-askorbinske kiseline, 9 mL polivinilpirolidona i 9 mL miliQ vode. Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj mješalici (razina snage 3). U reakcijsku smjesu dodaje se, kap po kap, ukupno 1 mL natrijeva selenita, brzinom 1 kap/sekunda. Tijekom dodavanja smjesa vidno poprima crvenu boju. Nakon dodavanja ukupnog volumena natrijeva selenita, otopina se miješa još 20 min. Reakcijska smjesa po završetku kemijske sinteze prikazana je na Slici 1. Po završetku reakcije smjesa se prebacuje u kivetu za centrifugiranje te centrifugira 20 min na 4100 g. Nakon odljevanja supernatanta, u istaložene čestice je dodano 15 mL miliQ vode i talog je dispergiran vorteksiranjem te je ponovno centrifugiran 20 min na 4100 g. Supernatant je dekantiran, a talog redispergiran u 5 mL miliQ vode te alikvotiran u 3 Eppendorf epruvete.



**Slika 1.** Uzorak 1, nakon završene reakcije po dodatku svih reagenasa i 20 minuta miješanja.

Za biogenu sintezu nanoselena (izradu uzoraka 2 i 3) u reakcijske posude je dodano:

Uzorak 2: 10 mL L-askorbinske kiseline, 1 mL ekstrakta komine masline i 17 mL miliQ vode (0,3 % EKM).

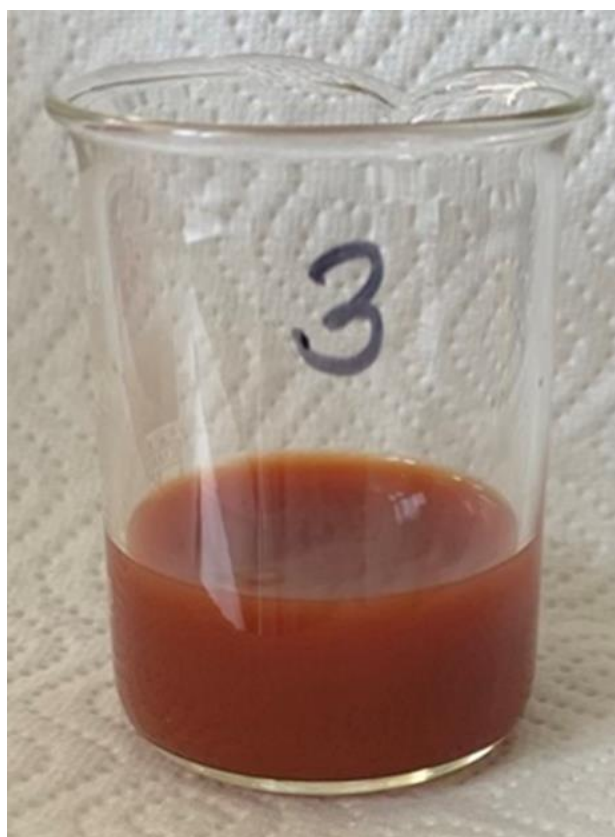
Uzorak 3: 10 mL L-askorbinske kiseline, 2 mL ekstrakta komine masline i 16 mL miliQ vode (0,6 % EKM).

Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj mješalici (razina snage 3). U reakcijsku smjesu dodaje se, kap po kap, ukupno 1 mL natrijeva selenita, brzinom 1 kap/sekunda. Tijekom dodavanja smjesa vidno poprima crvenu boju. Nakon dodavanja ukupnog volumena natrijeva selenita, otopina se miješa još 20 min. Tijekom miješanja, reakcijske smjese su fotografirane svakih 5 minuta. Reakcijske smjese nakon 20 min prikazane su na Slici 2 i na Slici 3.

Po završetku reakcije smjesa se prebacuje u kivetu za centrifugiranje te centrifugira 20 min na 4100 g. Nakon odlijevanja supernatana, u istaložene čestice je dodano 15 mL miliQ vode i talog je dispergiran vorteksiranjem te ponovno centrifugiran 20 min na 4100 g. Supernatant je dekantiran, a talog redispergiran u 5 mL miliQ vode te alikvotiran u 3 Eppendorf epruvete.



**Slika 2.** Uzorak 2, nakon završene reakcije po dodatku svih reagenasa i 20 minuta miješanja.



**Slika 3.** Uzorak 3, nakon završene reakcije po dodatku svih reagenasa i 20 minuta miješanja.

### **3.1.5. Priprema slijepih proba**

Za potrebe istraživanja pripremljene su i slijepa probe EKM, koje ne sadrže nanočestice selen. Slijepa proba oznake S2 sadrži 0,3 % EKM, isto kao i uzorak 2, dok slijepa proba S3 sadrži 0,6 % EKM, kao i uzorak 3. Pripremljene su na isti način kao i uzorci 2 i 3, ali bez dodatka natrijeva selenita.

Za izradu slijepa probe 2 u reakcijskoj posudi miješa se 10 mL L-askorbinske kiseline, 1 mL ekstrakta komine masline i 18 mL vode, a za izradu slijepa probe 3, 10 mL L-askorbinske kiseline, 2 ml ekstrakta komine masline i 17 mL vode. Nakon toga, slijepa probe centrifugiraju se 20 minuta na 4100 g. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantiran, a talog redispersiran u 5 mL miliQ vode te alikvotiran u Eppendorf epruvete.

## 3.2. Metode

U eksperimentalnom dijelu pripremljeni uzorci ispitani su koristeći laboratorijske metode za kvantitativnu analizu veličina nastalih čestica (DLS), određivanje stabilnosti disperzije (zeta potencijal), određivanje reduktivnog (Folin-Ciocalteu) te antiradikalnog (TEAC i ORAC) kapaciteta.

### 3.2.1. Mjerenje raspodjele veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS)

DLS je metoda za određivanje veličine čestica u suspenziji, a temelji se na činjenici da će čestice, koje se u suspenziji kreću Brownovim gibanjem, izlaganjem laserskoj svjetlosti, raspršiti tu svjetlost. Dinamičkim raspršenjem svjetlosti mjeri se Brownovo gibanje, koje je izraženo kao translacijski koeficijent difuzije (D). Brownovo gibanje je nasumično kretanje čestica u uzorku pod utjecajem molekula otapala koje ih okružuju te direktno ovisi o veličini čestica; kod manjih čestica ono je brže jer su međusobno udaljenije molekulama otapala, dok je kod onih većih sporije. Iz izmjerenog podatka o translacijskom koeficijentu difuzije, uz definiranu temperaturu i viskoznost tekućine, promjer čestica izračuna se Stokes-Einsteinovom jednadžbom.

Intenzitet raspršene svjetlosti, kao i kut pod kojim je svjetlost raspršena, ovisi o veličini čestica. Prema Rayleighovoj aproksimaciji, intenzitet raspršenog zračenja proporcionalan je veličini čestica. Na temelju toga, primarna informacija dobivena DLS metodom je izražena kao raspodjela veličine čestica po intenzitetu. Ukoliko je takva raspodjela asimetrična ili daje više pikova, postoji mogućnost transformiranja raspodjele veličine čestica po intenzitetu u raspodjelu po volumenu čestica pomoću Mieove teorije. Na rezultate, uz temperaturu, utječu i promjene na površini čestica, poput adsorpcije polimernog sloja (Orešković, 2015).

Uvjeti mjerenja bili su:

Izvor svjetlosti: 632,8 nm crveni laser, 10 mW

Tri kuta detekcije raspršenja: prednji 13°, bočni 90°, stražnji 173°

Veličina čestica: raspon mjerenja 0,3 nm – 10 μm

Minimalni volumen uzorka: 3 μL

Zeta potencijal: raspon mjerenja: bez ograničenja; minimalni volumen: 20 μl

Maksimalna provodnost uzorka: 260 mS/cm (www.irb.hr).

Nakon pripreme uzoraka razrjeđenjem, 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka stavljeno je u kivetu te u uređaj za mjerenje intenziteta raspršene svjetlosti. Za svaki uzorak napravljeno je 6 mjerenja intenziteta.

### **3.2.2. Mjerenje zeta potencijala**

U koloidnoj disperziji, površine čestica dispergirane faze mogu imati električni naboj zbog adsorpcije nekog iona iz otopine ili disocijacijom površinskih skupina. Nabijena površina čestice privlači ione suprotnog naboja, kojih je u blizini čestice najviše, a udaljavanjem se smanjuje njihov broj.

Ti ioni čine dvostruki električni sloj oko čestice. Neposredno uz površinu čestice je prvi sloj, koji se zove Sternov sloj. Njegova debljina je reda veličine iona. Uz Sternov sloj se nalazi drugi, difuzijski sloj, čije je ime Gouy-Chapmanov sloj.

Kada se otopina izloži električnom polju, nabijene čestice putuju prema elektrodi suprotnog predznaka, tj. dolazi do pojave koja se zove elektroforetska pokretljivost. S tim česticama giba se Sternov sloj, kao i dio „vezanih“ molekula otapala, te oni zajedno čine plohu smicanja. Potencijal na udaljenosti te plohe smicanja zove se zeta potencijal ( $\zeta$ ). Zeta potencijal može se odrediti iz elektroforetske pokretljivosti čestica te je prikaz stabilnosti disperzija. Što je zeta potencijal veći, tim više se čestice međusobno odbijaju, što smanjuje vjerojatnost za aglomeraciju i time čini disperziju stabilnijom. Isto tako i obrnuto: manji potencijal povećava vjerojatnost međusobnog spajanja čestica zbog manjih sila međusobnog odbijanja. Zeta potencijal mjeri se u milivoltima (mV), a opću granicu između stabilnog i nestabilnog koloidnog sustava čini vrijednost zeta potencijala od +30 mV, odnosno -30 mV. Čestice čiji je zeta potencijal viši od +30 mV, odnosno niži od -30 mV, smatraju se stabilnima (Jug i Vanić, 2017).

Nakon pripreme uzoraka razrjeđenjem, po 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka stavljeno je u kivetu te u uređaj za mjerenje zeta potencijala. Za svaki uzorak izmjerene su po 3 vrijednosti zeta potencijala.

### **3.2.3. Mjerenje redukcijskog potencijala nanočestica Folin-Ciocalteu metodom**

Postupak mjerenja redukcijskog potencijala nanočestica proveden je prema postupku Ainsworth i Gillespie (2007). Folin-Ciocalteu metoda je jednostavna i reproducibilna metoda za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka, odnosno kvantitativno određivanje

ukupnih fenola u uzorku. Temelji se na kemijskoj reakciji između uzorka i Folin-Ciocalteu reagensa (FC reagensa). FC reagens je smjesa fosfovolframata i fosfomolibdata i žute je boje. Kemijske skupine koje imaju reduktivna svojstva reduciraju fosfomolibdate i fosfovolframate iz reagensa u alkalnom mediju. U fenolnim komponentama uzorka to su hidroksilne skupine, no moguće je reducirati FC reagens i od strane drugih prisutnih komponenti reduktivnih svojstava, poput askorbinske kiseline i reduktivnih šećera. Tim procesom nastaju plavo obojeni produkti, kompleksi nepoznate strukture (Ainsworth i Gillespie, 2007). Intenzitet obojenja je proporcionalan udjelu komponenti s redukcijskim potencijalom u uzorku te se mjeri spektrofotometrijski na 750 nm. Kao referentni standardni spoj koristi se galna kiselina, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti miligrama galne kiseline po litri (GAE-Gallic Acid Equivalence).

### **Priprema reagenasa**

Za ispitivanje uzoraka prema Folin-Ciocalteu metodi, reagensi se pripremaju na sljedeći način:

Folin-Ciocalteu reagens: Na dan analize se razrijedi destiliranom vodom u omjeru 1:1.

Natrijev karbonat ( $Na_2CO_3$ ): 6 grama natrijeva karbonata se otopi u miliQ vodi. Otopina se zagrijava na plameniku, ohladi te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, koja se nadopuni miliQ vodom do oznake.

Ishodna otopina galne kiseline, 1 mM: Otopi se 0,85 mg galne kiseline,  $M_r=170,12$  g/mol, u 5 mL miliQ vode kako bi se dobila 1 mM, odnosno 1 mmol/L, galna kiselina za baždarni pravac (ishodna otopina galne kiseline).

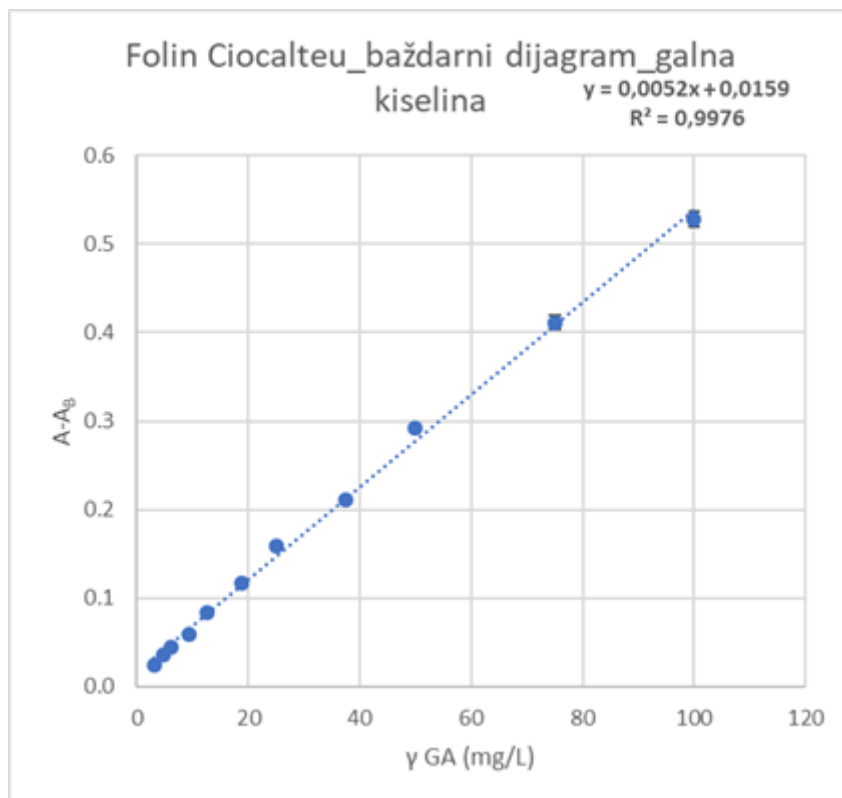
Uzorci: Uzorci 1, 2 i 3 se razrijede 8 puta.

### **Izrada baždarnog dijagrama**

Ishodna otopina galne kiseline (1 mM = 170,12 mg/L) razrijeđena je miliQ vodom kako bi se dobile otopine različitih koncentracija, redom: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 38 mg/L, 25 mg/L, 19 mg/L, 13 mg/L, 9 mg/L, 6 mg/L, 5 mg/L te 3 mg/L. Razrjeđivanje je rađeno direktno pipetiranjem u jažice, pipetirajući za svaku koncentraciju odgovarajući omjer volumena ishodne otopine galne kiseline (170,12 mg/L) i miliQ vode. Nakon toga, obavi se priprema i samo mjerenje istim postupkom kao i za uzorke. Jednako kao i za analizu uzoraka, pripremi se i *blank* otopina galne kiseline za mjerenje. Apsorbancija se mjeri na 750 nm. Od dobivenih vrijednosti apsorbancije galne kiseline različitih koncentracija (A), oduzeta je apsorbancija



*blank* otopine galne kiseline ( $A_B$ ) te se ta razlika koristi za izradu baždarnog dijagrama, koji prikazuje njezinu ovisnost o miligramima galne kiseline po litri (Slika 4).



**Slika 4.** Baždarni dijagram za određivanje ukupnog reduksijskog potencijala uzorka (izraženog kao ekvivalenti galne kiseline).

## Postupak

Apsorbancije uzoraka mjerene su u triplikatima. U mikrotitarsku pločicu od 96 jažica je pipetirano po 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenih uzoraka, svaki u 4 jažice; triplikati uzoraka za mjerenje reakcije te po jedan *blank* za svaki uzorak. Kao kontrola je umjesto uzorka pipetirano 20  $\mu\text{L}$  miliQ vode. Zatim je u svaku jažicu dodano 50  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa (10 %) te je 5 minuta miješano i inkubirano na 37 °C. U *blank* uzorka, umjesto FC reagensa, stavljen je natrijev karbonat u istoj količini. Nakon toga je u svaku jažicu dodano po 160  $\mu\text{L}$  700 mM natrijeva karbonata te je započeto miješanje i inkubacija na 37 °C, koja traje 30 minuta. Miješanje sadržaja pločica u uređaju traje 60 sekundi te je svakih 10 minuta očitana apsorbancija uzoraka na 750 nm, čime je praćen tijek reakcije.

### 3.2.4. Mjerenje antiradikalne aktivnosti nanočestica TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) metodom

TEAC antiradikalna učinkovitost uzoraka određena je prema modificiranoj metodi Re i suradnika (1999). Metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da neutralizira  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikal, stoga se naziva još i ABTS metoda. ABTS je 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat). Navedena reakcija rezultira obezbojenjem reakcijske otopine i smanjenjem njezine apsorbancije, što predstavlja mjerenu veličinu.

$\text{ABTS}^{\cdot+}$  je radikal koji se proizvodi oksidacijom bezbojnog ABTS-a uz pomoć oksidansa, kao što su kalijev persulfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), manganov dioksid ( $\text{MnO}_2$ ) ili peroksil radikali. Nastali radikal je stabilan te ima kromofor koji daje plavo-zeleno obojenje.

Topljiv je u vodi i organskim otapalima, stoga se ova metoda može koristiti i za hidrofilne i za lipofilne spojeve. Također, hvatanje tog radikala se može mjeriti u širokom pH području. Apsorbira na nekoliko valnih duljina, a apsorbancija se mjeri na 750 nm, gdje su najmanje mogućnosti neželjenih interferencija.

Kao referentni spoj se, između ostalih mogućnosti, može koristiti i Trolox®, (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), prema čemu je metoda dobila ime, a dobivene vrijednosti antioksidacijskog potencijala se izražavaju kao miligrami Trolox® ekvivalenata po litri (Re i sur, 1999).

## Priprema reagenasa

Za ispitivanje uzoraka reagensi se pripremaju na sljedeći način:

ABTS stock otopina (7mM): 10 mg ABTS-a se otopi u 2,78 mL miliQ vode te nastaje 7 mM ABTS otopina.

Otopina kalijevog persulfata ( $K_2S_2O_8$ ): U odmjernu tikvicu od 10 mL se izvaže 4,41 mg kalijeva persulfata, koji se otopi u 5 mL miliQ vode te nadopuni miliQ vodom kako bi nastala otopina kalijeva persulfata od 2,45 mM.

Otopina ABTS radikala: U jednakim omjerima se pomiješaju ABTS stock otopina i otopina kalijevog persulfata. Time započinje reakcija stvaranja obojenog radikala. Smjesa mora biti pohranjena u tami na sobnoj temperaturi 12 h. Nakon toga otopini se prilagodi razrjeđenje i izmjeri apsorbancija, kako bi ona na 750 nm iznosila  $0,700 \pm 0,02$ .

Trolox® stock otopina: Izvaže se 12,50 mg Troloxa®,  $M_r=250,29$  g/mol, te se otopi u 5 mL 96 %-tnog etanola. Time se dobije otopina koncentracije 10 mM, odnosno 10 mmol/L.

Radne otopine Troloxa®: 120  $\mu$ L stock otopine Troloxa®, koncentracije 10 mmol/L, odnosno 10000  $\mu$ mol/L, pomiješa se s 11880  $\mu$ L vode. Time se dobije otopina Troloxa® koncentracije 400  $\mu$ mol/L, čijim se daljnjim razrjeđivanjem napravi koncentracijski niz za baždarni dijagram.

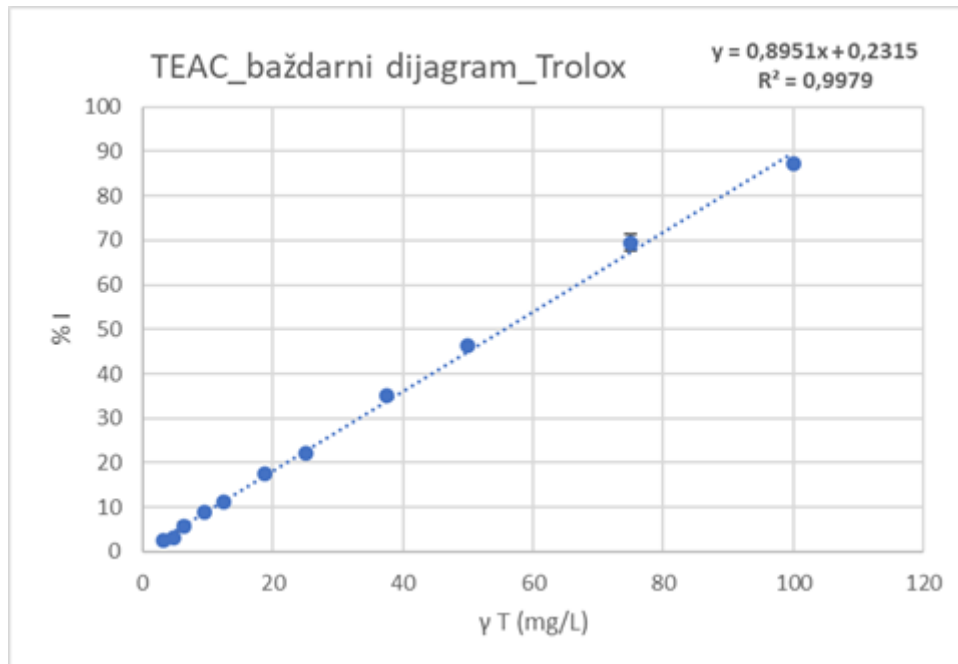
Uzorci: Potrebno je da razrijeđeni uzorak smanjuje apsorbanciju  $ABTS^{\cdot+}$  radikala za minimalno 50 %. Mjerenjem gašenja apsorbancije tog radikala uzorcima koji su bili različitih razrjeđenja, utvrđeno je da je optimalno razrjeđenje za svaki uzorak 8 puta, stoga su uzorci razrijeđeni 8 puta.

## Izrada baždarnog dijagrama

Baždarni dijagram izrađuje se mjerenjem apsorbancija radnih otopina Troloxa® poznatih koncentracija, svaki u triplikatu. Koncentracijski niz napravljen je razrjeđivanjem Troloxa® koncentracije 400  $\mu$ M, odnosno 100 mg/L, vodom. Koncentracije korištene za baždarni dijagram su: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 38 mg/L, 25 mg/L, 19 mg/L, 13 mg/L, 9 mg/L, 6 mg/L, 5 mg/L i 3 mg/L. U svaku jažicu dodaje se po 20  $\mu$ L otopine Troloxa® svake koncentracije, nakon čega se u svaku jažicu doda po 200  $\mu$ L ABTS radikala. U jažice, koje predstavljaju *blank* Troloxa®, se umjesto radikala dodaje 200  $\mu$ L vode.

Apsorbancija se mjeri nakon tri minute. Izmjerenoj vrijednosti za svaku koncentraciju Troloxa® oduzme se vrijednost apsorbancije *blanka* Troloxa®.

Na temelju dobivenih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju, izrađen je baždarni dijagram. On služi za očitavanje vrijednosti antioksidacijskog potencijala, izražene kao miligrami Trolox® ekvivalenta po litri (Slika 5).



**Slika 5.** Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka (izraženog kao Trolox® ekvivalenti).

### Postupak

Apsorbancije uzoraka su mjerene u kvadriplikatima, stoga je u jažice pipetirano po 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka 5 puta, od čega po jedna jažica služi za *blank* svakog uzorka. U svaki od kvadriplikata uzorka dodano je po 200  $\mu\text{L}$   $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikala. U *blank* svakog uzorka, umjesto radikala, dodano je po 200  $\mu\text{L}$  miliQ vode. Za izračun početne apsorbancije radikala napravljene su 4 kontrolne jažice u koje su stavljene po 200  $\mu\text{L}$   $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikala i 20  $\mu\text{L}$  miliQ vode. Apsorbancija je mjerena nakon 3 minute. Od svake izmjerene vrijednosti oduzeta je apsorbancija odgovarajućeg *blanka*, čime je dobivena konačna apsorbancija za svaku jažicu.

Reakcijom s  $ABTS^{\cdot+}$  radikalom, svaki uzorak inhibira njegovu apsorbanciju, a postotak inhibicije (%I) apsorbancije izračuna se prema formuli:

$$\% I = \frac{A_{max} - A}{A_{max}} \times 100,$$

gdje je:  $A_{max}$  - korigirana apsorbancija  $ABTS^{\cdot+}$  radikala nakon 3 minute,

$A$  - korigirana apsorbancija za svaki uzorak nakon 3 minute,

% I- postotak u kojem određeni uzorak inhibira radikal.

Iz postotka inhibicije apsorbancije radikala za svaki uzorak, izračunate su vrijednosti antioksidacijskog potencijala prema baždarnom dijagramu, prikazanom na Slici 5. Pošto su mjereni uzorci razrijeđeni 8 puta, potrebno je dobivene vrijednosti za razrijeđene uzorke ( $TE_{8x}$ ) prilagoditi uzorcima prije razrjeđenja, množeći dobiven iznos s razrjeđenjem.

### **3.2.5. Mjerenje antiradikalne učinkovitosti nanočestica ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) metodom**

Analiza ORAC antiradikalne učinkovitosti nanočestica određena je prema modificiranom postupku Gupte i suradnika (2009). ORAC je metoda koja mjeri sposobnost antioksidansa da inhibira oksidacije uzrokovane peroksilnim radikalom i mjeri je ukupnog antioksidacijskog potencijala.

AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropan)-dihidroklorid) izvor je peroksilnog radikala;  $ROO^{\cdot}$ , na način da ga stvara u prisutstvu kisika. Inkubacijom s fluorescentnom probom, radikal nastao iz AAPH uzrokuje oksidaciju probe, čime dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije. Ukoliko se uz AAPH i fluorescentnu probu inkubira još i antioksidans, on će dati svoj vodik peroksilnom radikal, čime će peroksilni radikal prijeći u manje reaktivan oblik.

Smanjenje reaktivnog oblika peroksilnog radikala dovodi do smanjene oksidacije fluorescentne probe, čime se smanjuje brzina pada intenziteta fluorescencije. Uređaj mjeri intenzitet fluorescencije u vremenu te se mjerenje odvija do kraja reakcije, odnosno do potpunog gubitka fluorescencije. Uređaj se podesi na fluorescentno kinetičko očitavanje, na valnu duljinu ekscitacije od 485 nm te emisije na 535 nm. Nakon mjerenja, izračuna se površina ispod krivulje pada intenziteta fluorescencije (AUC), vrijednost iz koje se dobije dinamička promjena fluorescencije probe.

Mjerenjem AUC vrijednosti koncentracijskog niza otopine Troloxa® kao kontrolnog antioksidansa, izradi se baždarni dijagram te se iz njega očitaju rezultati, koji se izraze kao ekvivalenti miligrama Troloxa® po litri (Cao i sur, 1993).

### **Priprema reagenasa**

Za provođenje ispitivanja reagensi se pripremaju na sljedeći način:

Fosfatni pufer (75 mM, pH 7,0): U čaši se izvaže 1,26 g kalijeva dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i 0,99 g kalijeva hidrogenfosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) te se otope u 100 mL miliQ vode. Koristeći otopine natrijeva hidroksida i klorovodične kiseline (NaOH/HCl), koncentracije 1 M, i pH-metar, pH otopine namjesti se na 7,0. Tada se otopina kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL te nadopuni miliQ vodom do oznake. Tako pripremljena otopina ostavi se da stoji mjesec dana na sobnoj temperaturi.

Stock otopina soli natrijeva fluoresceina (1 mM u 75 mM fosfatnom puferu, pH 7,0): 18,80 mg soli natrijeva fluoresceina se u čaši otopi u 75 mM fosfatnom puferu te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL, gdje se miliQ vodom nadopuni do oznake. Otopina se filtrira kroz filter papir kako bi se uklonile neotopljene čestice. Nakon toga, stavi se da stoji u tami na 4°C nekoliko mjeseci.

Radna otopina soli natrijeva fluoresceina (5 μM): 0,10 mL stock otopine fluoresceina od 1 mM se razrijedi fosfatnim puferom do 20 mL kako bi se dobila otopina od 5 μM. Stavi se da stoji u ledu i zaštićeno od svjetlosti do pokusa.

Stock otopina Troloxa® (20 mM u 75 mM fosfatnom puferu): 7,50 mg Troloxa® ( $M_r = 250,29$  g/mol) se otopi u 1,50 mL 96 %-tnog etanola u Eppendorf epruveti od 2 mL. Takva otopina podijeli se na alikvote od 200 μL i pohrani tijekom 4 mjeseca na tamnom i na temperaturi -80 °C.

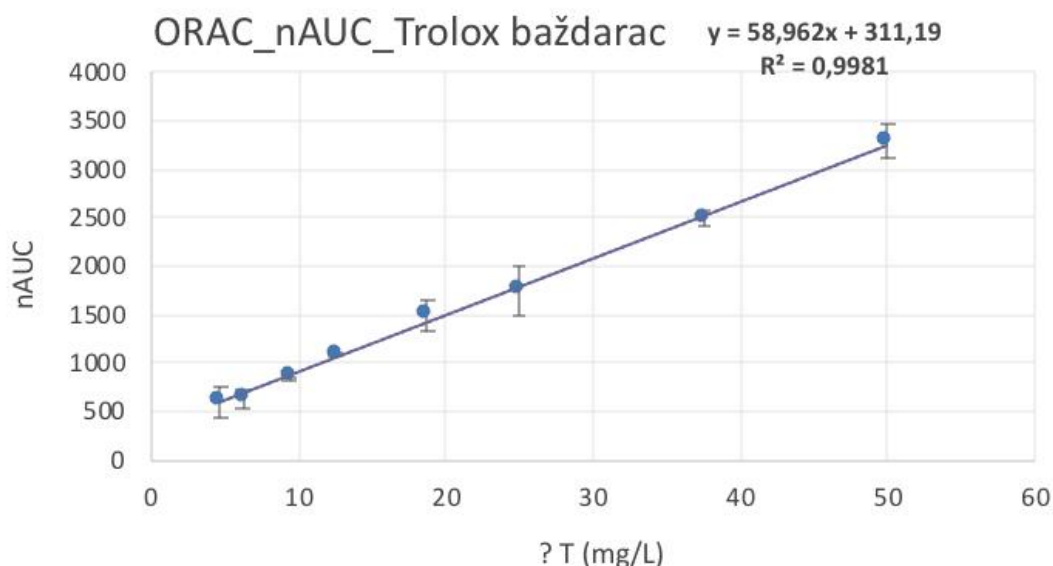
Radne otopine Troloxa® različitih koncentracija: Iz 20 mM stock otopine Troloxa®, odnosno otopine koncentracije 500 mg/L, razrjeđivanjem u različitim volumenima pripremljenog fosfatnog pufera pripremi se koncentracijski niz Troloxa®, a koncentracije iznose: 50 mg/L, 38 mg/L, 25 mg/L, 19 mg/L, 13 mg/L, 9 mg/L, 6 mg/L, 5 mg/L te 3 mg/L.

AAPH (2,2-azobis-2-metil-propanimidamid, dihidroklorid): 0,20 g AAPH izvaže se u Falcon epruveti i otopi u 5 mL fosfatnog pufera od 75 mM do konačne koncentracije od 150 mM. Pohrani se u ledu i na tamnom do uporabe.

Uzorci: Analizirani uzorci razrijede se 50 puta.

### Izrada baždarnog dijagrama

Na crnoj mikrotitarskoj pločici je, kao što je u opisu postupka navedeno za uzorke, na isti način pripremljen koncentracijski niz radnih otopina Troloxa®, u triplicatu za svaku koncentraciju. Nakon mjerenja dobivenih rezultata pada intenziteta fluorescencije u vremenu, izračunata je površina ispod dobivene krivulje (AUC) za svaku jažicu, odnosno srednja vrijednost za svaku koncentraciju (nAUC). Iz vrijednosti nAUC, u odnosu na koncentracije Troloxa®, izrađen je baždarni dijagram prikazan na Slici 6. Mjerenjem AUC vrijednosti uzoraka, iz baždarnog dijagrama se računa njihov antioksidacijski potencijal, izražen kao ekvivalenti Troloxa® u miligramima po litri.



**Slika 6.** Baždarni dijagram površina ispod krivulje pada fluorescencije u vremenu za izračun antioksidacijskog potencijala (izraženog kao ekvivalenti Troloxa® u miligramima po litri).

## Postupak

Na crnu mikrotitarsku pločicu u svaku jažicu pipetirano je 25  $\mu\text{L}$  svakog uzorka u kvadriplikatu. Kao kontrola, također u kvadriplikatu, umjesto uzorka stavljeno je 25  $\mu\text{L}$  miliQ vode. Nakon toga u svaku jažicu dodano je po 150  $\mu\text{L}$  fluoresceina. Pločica je stavljena u uređaj i 10 minuta grijana na 37 °C. Nakon toga, pločica je izvađena te je u svaku jažicu dodano po 25  $\mu\text{L}$  AAPH. Odmah nakon dodatka AAPH, mikrotitarska pločica stavljena je natrag u uređaj, gdje je započeto mjerenje intenziteta fluorescencije u trajanju od sat vremena. Nakon obavljenog pokusa, dobiveni su rezultati izmjerenog intenziteta fluorescencije nakon svakog kruga mjerenja, za svaku jažicu. Mjerene vrijednosti su pad intenziteta fluorescencije fluorescentne probe u vremenu uslijed gašenja njezine fluorescencije radikalom, te produljenje vremena potrebnog za pad te fluorescencije zbog utišavanja radikala antioksidansima iz uzoraka. Izmjereni rezultati fluorescencije preračunaju se u relativni postotak intenziteta fluorescencije na način da se prva fluorescencija koju je izmjerio uređaj smatra 100 %-tnom, a zadnja izmjerena fluorescencija 0 %-tnom. Za svaku jažicu dobiven je dijagram ovisnosti relativnog postotka intenziteta fluorescencije o vremenu. Iz tih podataka, primjenom programa za izračunavanje površine ispod krivulje, za svaku jažicu izračunata je odgovarajuća površina ispod krivulje (AUC). Pošto su uzorci mjereni u kvadriplikatima, za svaki uzorak pronađena je srednja vrijednost površine ispod krivulje te je od svake dobivene vrijednosti oduzeta površina ispod krivulje kontrole (bez uzorka), čime je dobivena konačna vrijednost AUC za svaki uzorak, označena kao nAUC.

Jednadžbom dobivenom baždarnim dijagramom, iz nAUC svakog uzorka, izračunata je antioksidacijska aktivnost svakog uzorka, koja je izražena kao ekvivalenti Troloxa®, u miligramima po litri. Pošto su uzorci razrijeđeni 50 puta prije mjerenja, dobiveni rezultati pomnoženi su s 50, kako bi se dobila srednja vrijednost antioksidacijskog potencijala svakog ishodnog uzorka.



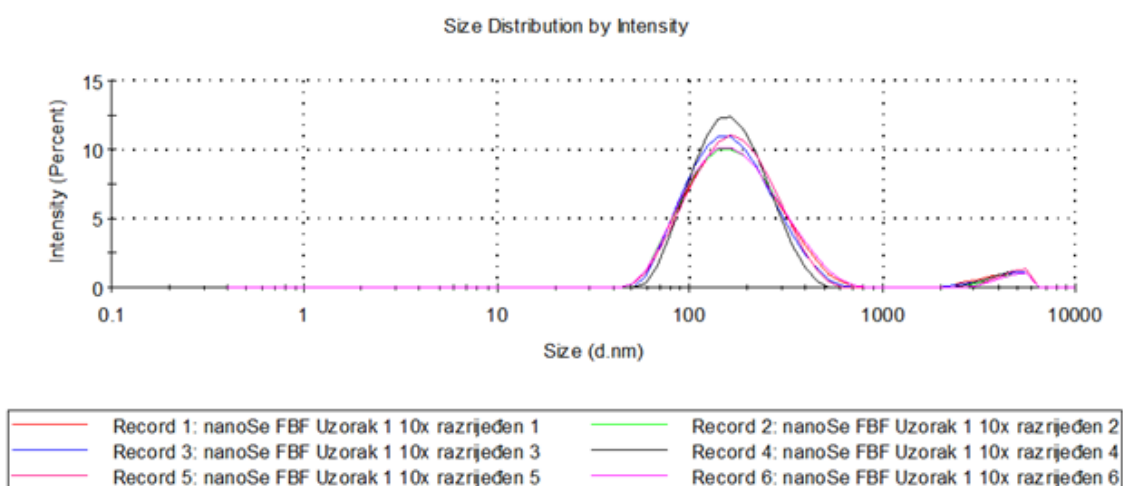
### 3.2.6. Statistička obrada podataka

Sinteze nanočestica provedene su u duplikatu. Za analizu raspodjele veličine čestica i zeta potencijala paralelni uzorci su pomiješani u jednakim omjerima i homogenizirani te su analize provedene u šesteroplikatu za raspodjelu veličine čestica ( $n = 6$ ) te u triplikatu ( $n = 3$ ) za mjerenje zeta potencijala. Za mjerenje antioksidativnog potencijala svaka paralela nanočestica mjerena je posebno u triplikatu (FC) ( $n = 2 \times 3 = 6$ ), odnosno četveroplikatu (TEAC, ORAC) ( $n = 2 \times 4 = 8$ ). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Za usporedbu rezultata korišten je ili studentov—t test ili jednosmjerna analiza varijance uz provođenje Bonferonijevog post hoc testa. Statistički značajna razlika je kod vrijednosti  $p \leq 0,05$ . Za provođenje statističke analize rezultata korišten je programski paket GraphPad Prism 6,0.

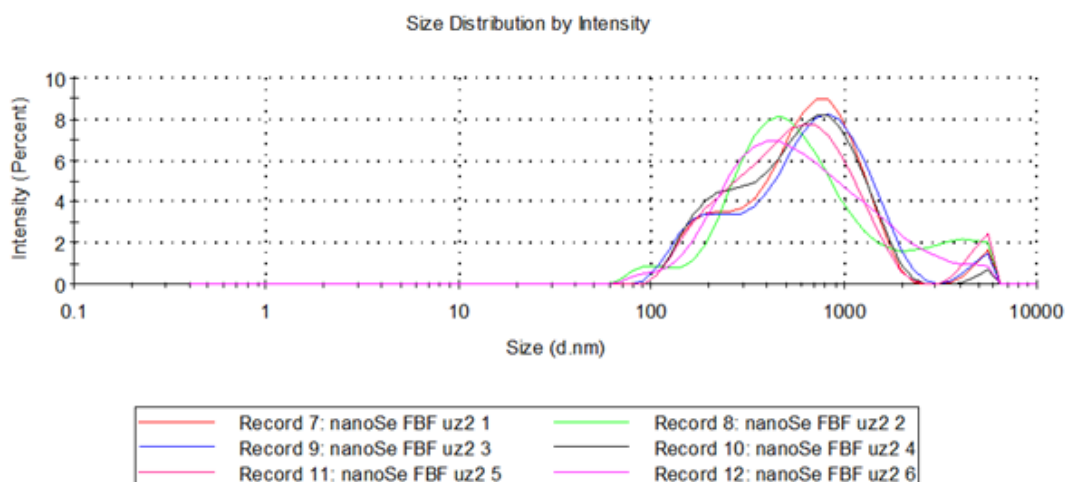
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Raspodjela veličine čestica

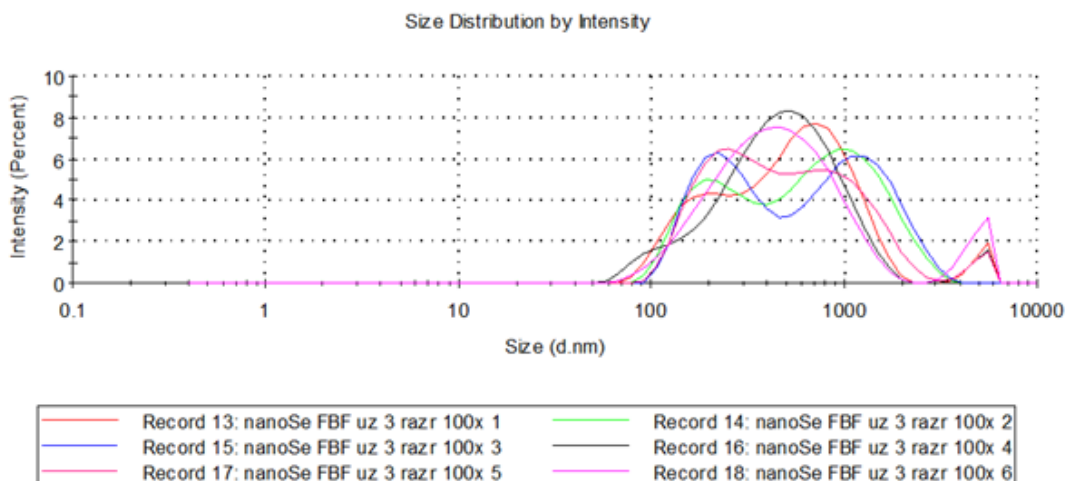
Nakon odgovarajućih razrjeđenja uzoraka 1, 2 i 3, u istima je izmjerena raspodjela veličine nanočestica metodom mjerenja intenziteta raspršene svjetlosti. Za svaki uzorak napravljeno je 6 mjerenja, a dobivene raspodjele veličine čestica po intenzitetu raspršene svjetlosti prikazane su na Slici 7, Slici 8 te Slici 9.



**Slika 7.** Raspodjela veličine čestica po intenzitetu za uzorak 1.



**Slika 8.** Raspodjela veličine čestica po intenzitetu za uzorak 2.



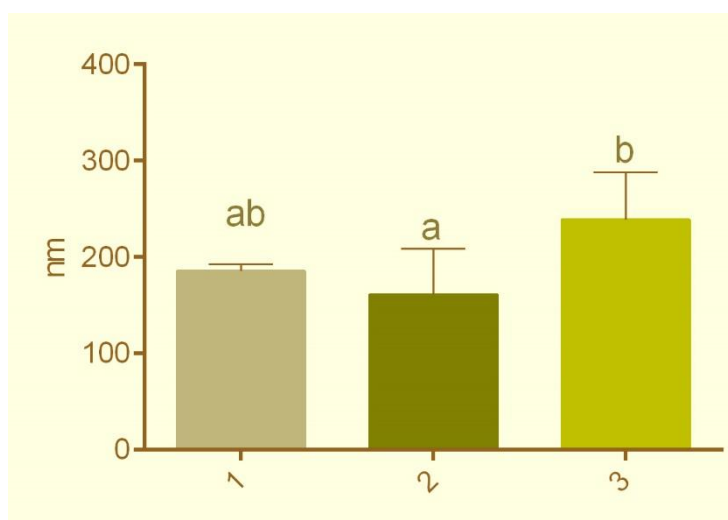
**Slika 9.** Raspodjela veličine čestica po intenzitetu za uzorak 3.

Dobivene vrijednosti raspodjele veličine nanočestica po intenzitetu za uzorke 1, 2 i 3 su statistički obrađene i izračunate su srednje vrijednosti, pripadajuće standardne devijacije, kao i relativne standardne devijacije, te se prikazane u Tablici 2.

**Tablica 2.** Srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije dimenzija nanočestica dobivene DLS metodom.

Uzorak	Srednji promjer nanočestica, nm		RSD, %
	Po intenzitetu		
	$\bar{X}$	SD	
Uzorak 1	185,82	7,09	3,81
Uzorak 2	161,27	47,07	29,19
Uzorak 3	239,05	49,03	20,51

Izračunate srednje vrijednosti raspodjele veličine nanočestica uzoraka 1, 2 i 3 po intenzitetu prikazane su i grafički na Slici 10.



**Slika 10.** Srednje vrijednosti raspodjele veličine nanočestica.

Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ). 1 - referentni uzorak pripremljen kemijskom sintezom; 2 - biogena sinteza (0,3 % EKM); 3 - biogena sinteza (0,6 % EKM).

Što su nanočestice selena manje, veća im je površina u odnosu na volumen te su biološki aktivnije; stoga je bilo poželjno dobiti što manje čestice. Finim nanočesticama smatraju se one veličine 1 nm – 100 nm. Međutim, korištenje ekstrakata biljaka za dodatnu stabilizaciju nanočestica oblaganjem, često povećava njihovu veličinu mjerenu DLS metodom do raspona od 100 nm – 200 nm (A. Wadhvani i sur., 2016; Jain i sur., 2015). Veličina ovisi o postupku i

uvjetima sinteze, a veličine biogeno sintetiziranih nanočestica pronađenih u literaturi kreću se u rasponu 1 nm – 200 nm.

Primjerice, nanočestice reducirane ekstraktom lista biljke *Aloe vera* imale su dimenzije u rasponu 7 nm – 48 nm (Alam i sur., 2019), a one sintetizirane s ekstraktom vinove loze (*Vitis vinifera*), pokazale su veličine 3 nm – 18 nm (Thaipong i sur., 2006). Kemijski sintetizirane čestice stabilizirane polivinilnim alkoholom pokazale su raspon veličina 76 nm – 150 nm (Hosnedlova i sur., 2018). Biogeno sintetizirane nanočestice korištenjem ekstrakta đumbira veličine su 100 nm – 120 nm (Menon i sur., 2019), dok je korištenje ekstrakta lista peršina (*Petroselinum crispum*) dalo 75 % čestica većih od 100 nm (Fritea i sur., 2017). Iz literature je vidljiv porast veličine čestica korištenjem dodatnih stabilizatora; nanočestice selena obložene polimerima izvanstaničnog matriksa (ESM), kao i one obložene goveđim serumskim albuminom (BSA), pokazale su veličine unutar raspona 100 nm – 200 nm (Jain i sur., 2015). Korištenjem PVP-a za oblaganje čestica dobivaju čestice veličine oko 200 nm (Maiyo i Singh, 2017).

Iz pretpostavki dobivenih iz navedene literature, dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjem. Analiza varijance dobivenih rezultata u kombinaciji s *post hoc* Tukeyjevim testom pokazala je da se srednji promjer biogenih nanočestica pripremljenih korištenjem EKM ne razlikuje značajno od srednjeg promjera referentnih nanočestica pripremljenih kemijskom sintezom korištenjem PVP-a ( $p > 0,05$ ). Čestice, nastale kemijskom sintezom s PVP-om, prosječne su veličine 185,82 nm, što je u skladu s literaturnim podacima, dok je prosječna veličina čestica obloženih EKM, u istom udjelu od 0,3 %, 161,27 nm. Usporedbom s navedenim radovima, veličina dobivenih čestica je unutar očekivanih raspona.

S druge strane, povećanje koncentracije EKM u reakcijskoj smjesi s 0,3 % na 0,6 %, rezultiralo je značajnim povećanjem srednjeg promjera dobivenih nanočestica, čiji je iznos srednje veličine 239,05 nm. Taj uzorak, zbog najvećeg udjela prirodnog ekstrakta, također pokazuje i veće rasipanje pikova od uzoraka 1 i 2, što je prikazano na Slici 9.

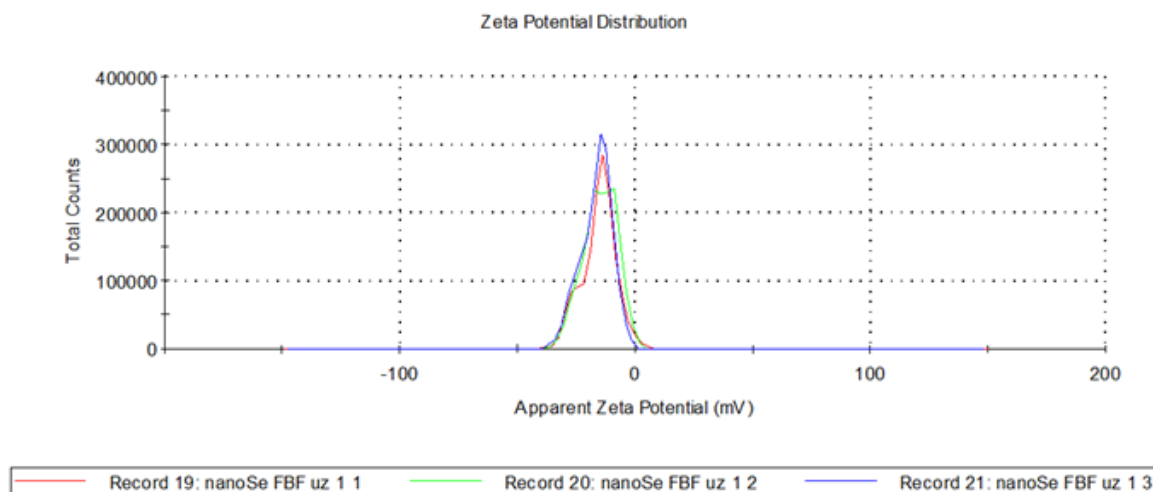
Utjecaj udjela komine korištene u sintezi na veličinu čestica, također je u skladu s očekivanjima. U radu Zhanga i suradnika (2018), pokazano je da veličina čestica raste porastom udjela polisaharida biljke *Lycium barbarum* korištene za oblaganje, a veličine su veće od 250 nm.

Očekivano, standardna odstupanja za biogeno sintetizirane uzorke, u iznosima 47,07 nm, za uzorak 2, te 49,03 nm, za uzorak 3, veća su od onog nastalog kemijskom sintezom, koje iznosi

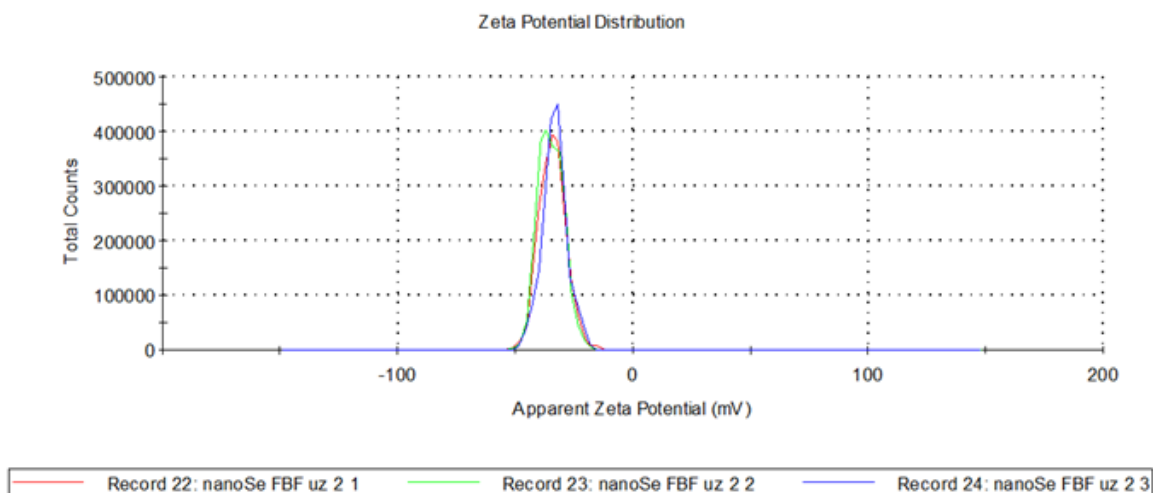
7,09 nm, što također pokazuje Tablica 2. Razlog tome je najvjerojatnije činjenica da se primjenom EKM značajno povećava kompleksnost sastava reakcijske smjese.

#### 4.2. Rezultati ispitivanja zeta potencijala

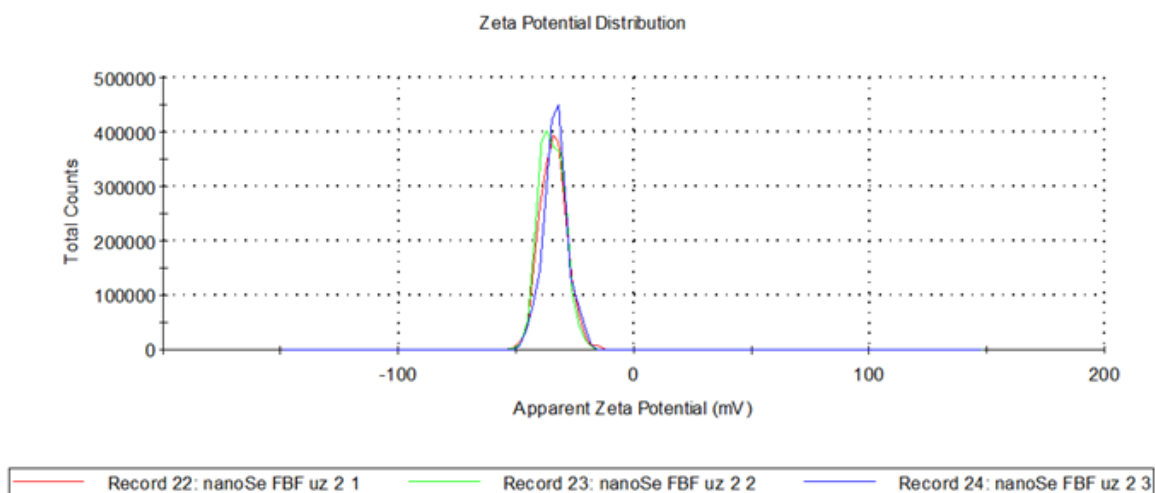
Rezultati mjerenja zeta potencijala pripremljenih nanočestica prikazani su na Slici 11, Slici 12 te Slici 13.



Slika 11. Raspodjela zeta potencijala za uzorak 1.



Slika 12. Raspodjela zeta potencijala za uzorak 2.



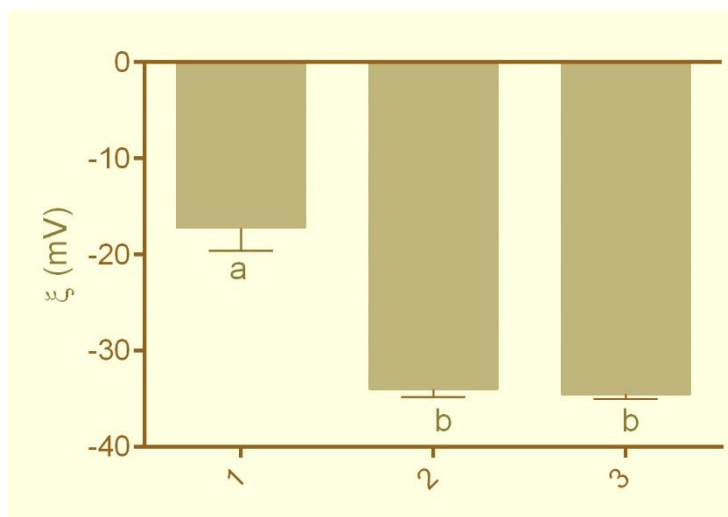
**Slika 13.** Raspodjela zeta potencijala za uzorak 3.

Dobivene vrijednosti su statistički obrađene i za svaki uzorak su izračunate srednje vrijednosti zeta potencijala, pripadajuća standardne devijacije te relativne standardne devijacije (Tablica 3).

**Tablica 3.** Srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije zeta potencijala uzoraka 1, 2 i 3.

Uzorak	Zeta potencijal, mV		RSD, %
	$\bar{X}$	SD	
<b>Uzorak 1</b>	<b>-17,20</b>	2,38	13,84
<b>Uzorak 2</b>	<b>-34,03</b>	0,80	2,35
<b>Uzorak 3</b>	<b>-34,53</b>	0,50	1,45

Izračunate srednje vrijednosti zeta potencijala uzoraka 1, 2 i 3 po intenzitetu prikazane su i grafički na slici 14.



**Slika 14.** Srednje vrijednosti zeta potencijala analiziranih uzoraka.

*Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ). 1 - referentni uzorak pripremljen kemijskom sintezom; 2 - biogena sinteza (0,3 % EKM); 3 - biogena sinteza (0,6 % EKM).*

Mjerenje zeta potencijala provedeno je u svrhu procjene stabilnosti koloidne suspenzije. Zeta potencijal je naboj, odnosno potencijal, na plohi smicanja čestica te je za postizanje stabilnosti uglavnom potrebno da njegov apsolutni iznos bude što veći. S većim nabojem, veće je međusobno odbijanje između čestica i manja vjerojatnost za njihovu aglomeraciju, čime je suspenzija stabilnija. Za stabilnu suspenziju potreban je apsolutni iznos zeta potencijala veći od 30 mV (Jug i Vanić, 2017). Iz dobivenih rezultata jasno se vidi da biogena sinteza nanoselena, u kojoj se kao sredstvo za oblaganje koristi EKM, rezultira značajno negativnijim zeta potencijalom nastalih čestica te da koncentracija EKM u reakcijskoj smjesi ne utječe na zeta potencijal dobivenih čestica. Za uzorak 2, odnosno 0,3 % komine, zeta potencijal iznosi -34,03 mV, dok dvostrukim povećanjem udjela komine, potencijal ostaje gotovo isti i iznosi -34,53 mV. Relativne standardne devijacije su 2,35 % za uzorak 2 te 1,45 % za uzorak 3, te njihov mali iznos ukazuje na točnost rezultata.

Generalno, negativniji zeta potencijal može ukazivati na stabilniju suspenziju. Ipak, ovdje je bitno naglasiti da se dva korištena sredstva za oblaganje (PVP i EKM) međusobno značajno razlikuju. PVP, zbog svoje polimerne strukture, stabilizira suspenziju uglavnom putem steričkih interakcija, koje sprječavaju aglomeraciju čestica nanoselena. U slučaju korištenja takvog tipa polimera, moguće je ostvariti i značajnu stabilizaciju sustava pri čemu apsolutna vrijednost zeta potencijala čestica ne mora biti pretjerano velika, što je u ovoj situaciji slučaj, gdje zeta potencijal takvog uzorka iznosi -17,20, s relativnom standardnom devijacijom od 13,84 %.

S druge strane, EKM je smjesa velikog broja različitih spojeva, od kojih je velik broj u blago kiselom pH reakcijske smjese nabijen. Stoga možemo pretpostaviti da svoj učinak oblaganja EKM ostvaruje putem elektrostatskih interakcija, što rezultira i značajno većom apsolutnom vrijednošću zeta potencijala u odnosu na kemijski sintetizirani nanoselen (Jain i sur., 2015).

EKM se u ovom slučaju pokazao kao dobar stabilizator nanočestica, neovisno o korištenoj koncentraciji. Osim što čestice obložene kominom spadaju u stabilne prema kriteriju apsolutne vrijednosti zeta potencijala, rezultati su zadovoljavajući i usporedbom s drugim radovima u kojima su čestice stabilizirane elektrostatskim silama. Primjeri su biogene nanočestice selena nastale s ekstraktom đumbira, čiji zeta potencijal iznosi -36 mV (Menon i sur., 2019), nanočestice selena proizvedene s ekstraktom lista pelargonije (*Pelargonium zonale*) imale su zeta potencijal od -24,6 mV (Fardsadegh i sur., 2018), one sintetizirane s ekstraktom lista peršina pokazale su zeta potencijal od -14,2 mV (Fritea i sur., 2017). Biogeno sintetizirane nanočestice selena s ekstraktom zelenog čaja, a obložene polisaharidima iz biljke *Lycium barbarum*, imale su zeta potencijal -24,1 mV (Zhang i sur., 2018). Rad u kojem su biogeni i kemijski nanoselen obloženi polimerima izvanstaničnog matriksa i goveđim serumskim albuminom, redom pokazuju zeta potencijale od -31,5 mV, odnosno, 38 mV (Jain i sur., 2015).

#### 4.3. Reduktivna sposobnost nanoselena

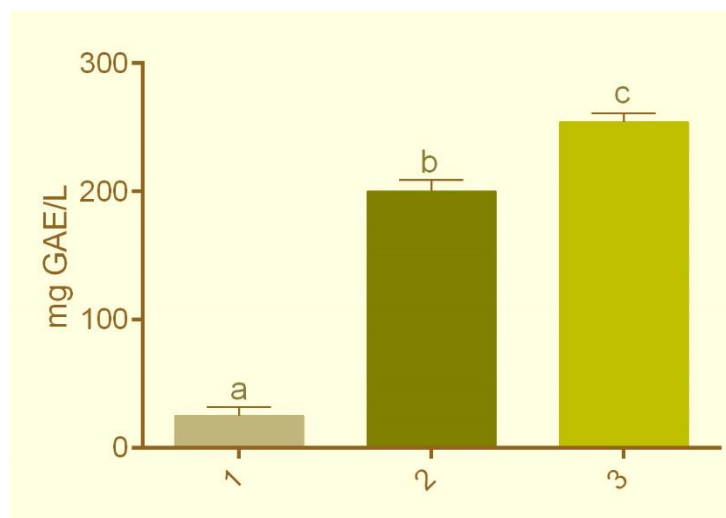
Vrijednosti reduktivnog potencijala pripremljenih nanočestica izraženi su kao ekvivalenti galne kiseline u miligramima po litri (mg/L GAE). Rezultati provedenih istraživanja prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije mjerenja reduktivne sposobnosti uzoraka.

Uzorak	GAE, mg/L		RSD, %
	$\bar{x}$	SD	
Uzorak 1	25	7	27
Uzorak 2	200	9	4,3
Uzorak 3	254	7	2,6



Srednje vrijednosti reduktivnog potencijala analiziranih uzoraka prikazane su na Slici 15.



**Slika 15.** Ukupni reduksijski potencijal analiziranih uzoraka.

Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ). 1 - referentni uzorak pripremljen kemijskom sintezom; 2 - biogena sinteza (0,3 % EKM); 3 - biogena sinteza (0,6 % EKM); GAE - ekvivalenti galne kiseline.

Dobiveni rezultati pokazuju da uzorci nanoselena dobiveni kemijskom sintezom pokazuju vrlo slabu reduktivnu aktivnost, što je možda posljedica zaostajanja dijela L-askorbinske kiseline u mjerenom uzorku. Naime, iako je selen nutrijent koji značajno doprinosi održavanju adekvatnog oksidativnog statusa organizma, on kao antioksidans djeluje kao dio selenoproteina koji kao enzimi sudjeluju u antioksidativnoj obrani organizma, stoga on sam nema direktnu reduktivnu učinkovitost *in vitro*. Antioksidacijski kapacitet kemijski sintetiziranih čestica iznosi 25 mg GAE/L. Relativna standardna devijacija za taj uzorak iznosi 27 %, što je visok postotak odstupanja, a može se objasniti broječno malim iznosom mjerene vrijednosti. Kako bi se optimiralo odstupanje od srednje vrijednosti za uzorak 1, valjalo bi prilagoditi razrjeđenje same mjerene otopine. Korištenjem EKM kao sredstva za oblaganje, nanočestice selena dobivaju i direktnu reduktivnu učinkovitost. Naime, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se polifenoli EKM adsorbiraju na površinu selenovih nanočestica te da pri tome zadržavaju svoju reduktivnu sposobnost, što je u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora (Aliakbarian i sur., 2011; Lafka i sur., 2011). Dobivene vrijednosti reduktivnog potencijala za biogeno sintetizirane uzorke iznosile su 200 mg GAE/L, za uzorak s 0,3 % komine, odnosno 254 mg GAE /L, za uzorak s 0,6 % komine.

Relativne standardne devijacije su im redom 4,3 %, odnosno, 2,6 %, što predstavlja prihvatljivo odstupanje. Osim značajne razlike u odnosu na kemijski sintetizirane čestice, razlika reduktivne sposobnosti značajna je i između uzoraka s različitim udjelima komine. Dva puta veći udio EKM u reakcijskoj smjesi rezultira nanočesticama 27% povećanog reduktivnog potencijala. Slijepe probe bez nanočestica su potvrdile reduktivni učinak polifenola komine masline.

Brojni su radovi u kojima je Folin-Ciocalteu metodom potvrđena prisutnost polifenola u komini masline i njihova reduktivna sposobnost. Potvrđeni su i u krutom otpadu masline i u vodenom (Leouifoudi i sur., 2015). U istom radu, HPLC metodom su dokazani fenolni alkoholi, kiseline, sekoiridoidi te flavonoidi. Također, komine dobivene iz različitih sorti maslina pokazuju značajne razlike reduktivnog potencijala (Leouifoudi i sur., 2014). U prijašnjim radovima, Folin-Ciocalteu metodom analizirana je komina masline sličnog porijekla, te je dobven iznos 281 mg GAE/ 100 g ekstrakta (Horvat, 2019). Usporedbom s navedenim, vidljivo je da je redukcijski potencijal polifenola komine dobiven u ovom radu u očekivanom rasponu.

Također, postoje radovi koji potvrđuju porast redukcijskog potencijala biogeno sintetiziranih nanočestica (u odnosu na kemijski sintetizirane). Primjerice, nanočestice srebra biogeno sintetizirane korištenjem različitih biljnih ekstrakata (ekstrakti biljaka *Zataria multiflora*, *Rosmarinus* sp., *Pelargonium graveolens*, *Chamaemelum nobil*, *Frenqueri aundulate*, *Achillea wilhemsii* te *Carthamus tinctorius* L.), pokazale su reduktivnu sposobnost raspona od 0,17 do 7,60 mg GAE/g , što se pokazalo proporcionalno udjelu polifenola u pojedinim biljkama (Goodarzi i sur., 2014). Vrijednost reduktivnog potencijala može ovisiti i o drugim uvjetima sinteze, međutim, rezultati dobiveni u ovom radu potvrdili su hipotezu da će polifenoli komine bitno poboljšati redukcijski kapacitet biogeno sintetiziranih nanočestica. U dostupnoj literaturi nisu pronađeni radovi oblaganja nanočestica selena ekstraktom komine masline za usporedbu.

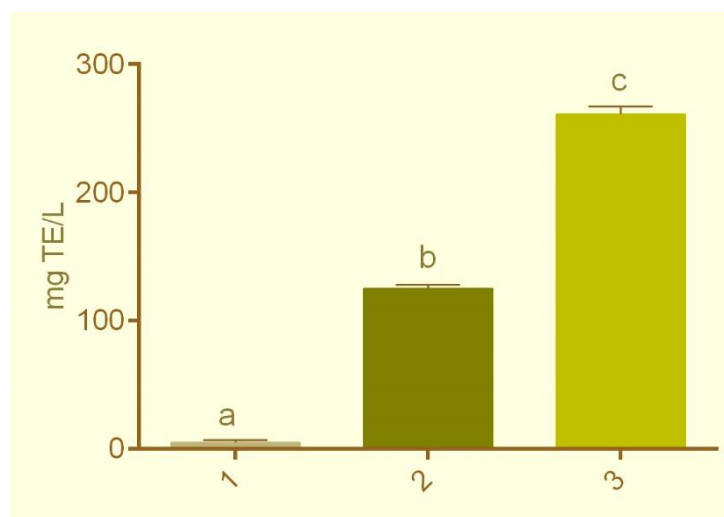
#### 4.4. Antiradikalna učinkovitost uzoraka

TEAC antiradikalni potencijal analiziranih uzoraka izražen je kao miligrami Trolox® ekvivalenta po litri (mg TE/L). Dobiveni rezultati prikazani su Tablici 5.

**Tablica 5.** TEAC antiradikalna učinkovitost analiziranih uzoraka.

Uzorak	TE, mg/L		RSD, %
	$\bar{X}$	SD	
Uzorak 1	5	2	42
Uzorak 2	125	3	2,4
Uzorak 3	261	6	2,2

Srednje vrijednosti TEAC antiradikalne učinkovitosti analiziranih uzoraka prikazane su na Slici 16.



**Slika 16.** TEAC antiradikalna učinkovitost analiziranih uzoraka.

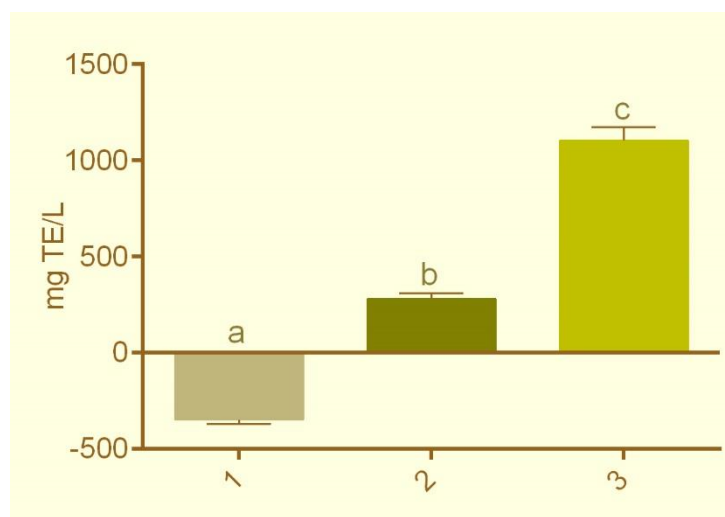
Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ). 1 - referentni uzorak pripremljen kemijskom sintezom; 2 - biogena sinteza (0,3 % EKM); 3 - biogena sinteza (0,6 % EKM); TE - ekvivalenti Troloxa®.

ORAC antiradikalni potencijal analiziranih uzoraka izražen je kao miligrami Trolox® ekvivalenta po litri (mg TE/L). Dobiveni rezultati prikazani su Tablici 6.

**Tablica 6.** ORAC antioksidacijska učinkovitost analiziranih uzoraka.

Uzorak	TE, mg/L		RSD, %
	$\bar{X}$	SD	
Uzorak 1	-348	21	5,9
Uzorak 2	281	30	10,7
Uzorak 3	1104	68	6,1

Srednje vrijednosti ORAC antiradikalne učinkovitosti analiziranih uzoraka prikazane su na Slici 17.



**Slika 17.** ORAC antiradikalna učinkovitost analiziranih uzoraka.

Stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ). 1 - referentni uzorak pripremljen kemijskom sintezom; 2 - biogena sinteza (0,3 % EKM); 3 - biogena sinteza (0,6 % EKM); TE - ekvivalenti Troloxa®.

Dobiveni rezultati pokazuju da se primjenom EKM, kao sredstva za oblaganje, značajno povećava antiradikalna aktivnost dobivenih nanočestica. Kao i u slučaju reduktivnog potencijala, TEAC antiradikalna učinkovitost kemijskih nanočestica bila je zanemariva (5 TE mg/L).

Adsorpcija polifenola EKM na površinu selenovih nanočestica rezultirala je značajnim povećanjem antiradikalnog djelovanja nanoselena. Nanočestice pripravljene s 0,3 % EKM imale su potencijal od 125 mg TE/L. Također, 100 %-tno povećanje koncentracije EKM u reakcijskoj smjesi rezultiralo je i dvostrukim povećanjem TEAC antiradikalne učinkovitosti, koja za uzorak 3 iznosi 261 TE mg/L. Relativno odstupanje za sve uzorke s kominom manje je od 3 %, dok je kod uzorka bez kumine ono 42 %, što je vjerojatno posljedica vrlo malog iznosa mjerenog parametra ili neadekvatno odabranog razrjeđenja uzorka za ovu metodu.

Isti trend je primijećen u slučaju ORAC antioksidativne aktivnosti, s tim da su za uzorak 3 dobivene značajno veće aktivnosti u odnosu na TEAC metodu. Antiradikalna učinkovitost za uzorak 1 bila je -348 mg TE/L, uz malu relativnu standardnu devijaciju od 5,9 %. Negativan iznos Trolox® ekvivalenata proizlazi iz negativne srednje površine ispod krivulje pada intenziteta za uzorak 1, nAUC, što znači da je kod uzorka 1 brže došlo do pada fluorescencije nego kod kontrole bez uzorka, odnosno, da je uz nanočestice obložene PVP-om manje inhibiran radikal nego što je bez njih. To bi teoretski moglo ukazivati na prooksidativnu aktivnost uzorka 1. Uzorci 2 i 3, imali su značajnu ORAC antiradikalnu aktivnost te je uočen veliki utjecaj udjela EKM u reakcijskoj smjesi na jačinu antiradikalne aktivnosti sintetiziranih nanočestica. Uzorak s 0,3 % ekstrakta kumine sadrži 281 mg TE/L, dok povećanjem udjela kumine dva puta, antioksidacijski potencijal naraste čak četiri puta, na 1104 mg TE/L, koliko sadrži uzorak 3. Relativne standardne devijacije u ovom postupku su nešto veće, od 6 % do 13 %. Uzroci povećanog relativnog odstupanja srednjeg rezultata u odnosu na ostale metode mjerenja antioksidacijskog kapaciteta upućuju na to da je uzrok te varijabilnosti vjerojatno u samoj izvedbi metode, a ne u pripremi uzoraka. Mogućnost unaprjeđenja ove metode je način pripreme i pipetiranja AAPH radikala, te poboljšavanje njegove homogenosti, ali i optimiziranje temperature, pošto je radikal podložan termalnoj dekompoziciji, što sve može imati značajan utjecaj na dobivene rezultate.

Navedeno je u skladu sa istraživanjima drugih autora koji navode da TEAC metoda često podcjenjuje antiradikalnu aktivnost kompleksnih sustava (npr. hrane i pića) (Zulueta i sur., 2009). Također, važno je napomenuti da je, među kemijskim metodama za mjerenje antioksidativnog potencijala, ORAC metoda najrelevantnija u smislu ekstrapolacije rezultata na *in vivo* uvjete jer koristi biološki relevantan izvor slobodnog radikala (peroksilni radikal) te uzima u obzir, ne samo stupanj inhibicije slobodnog radikala, već i vrijeme djelovanja (Prior, 2015).

Kao i za reduktivni potencijal Folin Ciocalteu metodom, TEAC i ORAC metodom potvrđena je očekivana antiradikalna učinkovitost komine masline. Očekivano je da udio fenolnih komponenti, određen Folin-Ciocalteu metodom, utječe na mogućnost hvatanja slobodnih radikala. Navedeno je dokazano u prijašnjim radovima, u kojima je mjeren reduktivni kapacitet, odnosno fenolne komponente, krutog i tekućeg otpada masline Folin-Ciocalteu metodom i njihove mogućnosti hvatanja radikala DPPH metodom (koja, kao i TEAC metoda, gašenje radikala bazira na doniranju elektrona antioksidansa), čiji su rezultati pokazali korelaciju između ta dva faktora (Leouifoudi i sur., 2015; Leouifoudi i sur., 2014). Rezultati dobiveni u ovom radu, uklapaju se u tu tezu. Sve korištene metode pokazale su značajno manje rezultate reduktivnog i antioksidativnog kapaciteta kemijski sintetiziranih nanočestica u odnosu na biogeno sintetizirane uzorke, kao i ovisnost antioksidativne učinkovitosti o udjelu EKM u reakcijskoj smjesi. Međusobna usporedivost rezultata dobivenih TEAC i ORAC metodom, dokazana je u radu u kojem je različitim metodama, između ostalih, i TEAC i ORAC metodama, mjeren i uspoređen antioksidativni kapacitet ekstrakta guave (Thaipong i sur., 2006).

Pozitivan utjecaj korištenja različitih biljnih ekstrakata na antiradikalnu učinkovitost biogeno sintetiziranih nanočestica dokazan je i radovima drugih autora. Primjerice, korištenje resveratrola u sintezi nanočestica pokazalo je značajno bolju mogućnost hvatanja  $ABTS^{\cdot+}$  radikala u odnosu na kemijski sintetizirane nanočestice (Kim i sur., 2016). Utjecaj zelene sinteze nanočestica selena s ekstraktom zelenog čaja i oblaganjem polisaharidima biljke *Lycium barbarum* na povećanu sposobnost hvatanja navedenog radikala, dokazana je TEAC metodom u radu Zhanga i suradnika (2018). Korištenje galne kiseline, kofeinske kiseline i kofeina u sintezi nanočestica silicijeva dioksida, rezultiralo je značajnim povećanjem njihove ORAC antiradikalne aktivnosti (Khalil i sur., 2020).

Povećanje antioksidativnog potencijala nanočestica poželjno je zbog mogućeg postizanja sinergističkog učinka sa samim selenom u organizmu, a može utjecati i na bolju biokompatibilnost.

## 5. ZAKLJUČCI

- Ekstrakt komine masline moguće je uspješno primijeniti kao sredstvo za oblaganje u biogenoj sintezi nanočestica selena u koncentracijama 0,3 % i 0,6 %.
- Primjena ekstrakta komine masline u sintezi nanočestica selena ne utječe značajno na raspodjelu veličine dobivenih nanočestica te su one uporedive s veličinama kemijski sintetiziranog nanoselena. Porastom udjela ekstrakta komine masline u reakcijskoj smjesi značajno raste i srednji promjer dobivenih nanočestica.
- Biogeno sintetizirane nanočestice selena imaju značajno veću apsolutnu vrijednost zeta potencijala (-34 mV) u odnosu na kemijski sintetiziran nanoselen. Značajno veća vrijednost zeta potencijala uzoraka sintetiziranih s kominom, u odnosu na one sintetizirane PVP-om, ukazuje na to da komina svoj učinak stabiliziranja ostvaruje uglavnom putem elektrostatskih interakcija, dok PVP stabilizaciju postiže steričkim interakcijama. Udio ekstrakta komine masline nema utjecaj na promjenu zeta potencijala, odnosno na stabilnost.
- Biogeno sintetizirane nanočestice selena imaju značajno veći reduktivni potencijal u odnosu na one kemijski sintetizirane (čiji je reduktivni potencijal zanemariv). Dvostruki porast udjela ekstrakta komine masline u reakcijskoj smjesi tijekom biogene sinteze nanoselena rezultira značajnim dodatnim povećanjem reduktivnog potencijala (za 27 %).
- Biogeno sintetizirane nanočestice selena imaju značajno veći antiradikalni potencijal u odnosu na kemijski sintetizirani nanoselen, koji pokazuje blagu prooksidativnu aktivnost. Porast udjela ekstrakta komine masline tijekom biogene sinteze nanoselena rezultira značajnim povećanjem antiradikalne učinkovitosti sintetiziranih nanočestica.
- Rezultati provedenih istraživanja ukazuju na potencijalne prednosti biogene sinteze nanočestica selena korištenjem ekstrakta komine masline.
- Daljnja istraživanja mogućnosti primjene ekstrakta komine masline u biogenoj sintezi nanoselena trebaju biti usmjerena na istraživanje stabilnosti, biokompatibilnosti te antioksidacijskih (i ostalih bioloških) učinaka sofisticiranijim *in vitro* metodama.

## 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.

Akretche H, Pierre G, Moussaoui R, Michaud P, Delattre C. Valorization of olive mill wastewater for the development of biobased polymer films with antioxidant properties using eco-friendly processes. *Green Chem*, 2019, 21, 3065-3073.

Alam H, Khatoon N, Raza M, Gosh PC, Sardar M. Synthesis and characterization of nano selenium using plant biomolecules and their potential applications. *Bionanoscience*, 2019, 9, 96-104.

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

Baron M, Melcova M, Opatrilova R, Zidkova J, Bjoklund G, Sochor J, Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13, 2107-2128.

Bećirović I. Distribucija selena u nekim tkivima odbite prasadi hranjene biofortificiranim kukuruzom. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, 2018.

Brek Savić T, Voća N, Krička T, Jurišić V. Komina masline kao izvor energije. *Glasnik zaštite bilja*, 2009, 32, 12-19.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 1993, 14, 303-311.

Castro-Puyana M, Mendiola JA, Ibanez E. Strategies for a cleaner new scientific discipline of green foodomics. *Trac-Trend Anal Chem*, 2013, 52, 23-35.

Deeb AA, Fayyad MK, Alawi MA. Separation of polyphenols from Jordanian olive oil mill wastewater. *Chromatogr Res Int*, 2012, 2012, 1-8.

Fardsadegh B, Vaghari H, Mohammad-Jafari R, Najian Y, Jafarizadeh-Malmiri H. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activities assessment of fabricated selenium nanoparticles using *Pelargonium zonale* leaf extract. *Green Process Synth*, 2019, 8, 191-198.



Fritea L, Laslo V, Cavalu S, Costea T, Vicas SI. Green biosynthesis of selenium nanoparticles using parsley (*Petroselinum crispum*) leaves extract. *Studium Universitatis "Vasile Goldis"*, 2017, 27, 203-208.

Gangadoo S, Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ, Chapman J. The synthesis and characterisation of highly stable and reproducible selenium nanoparticles. *Inorg Nano-Met Chem*, 2017, 47, 1568-1576.

Goodarzi V, Zamani H, Bajuli L, Moradshahi A. Evaluation and antioxidant potential and reduction capacity of some plant extracts in silver nanoparticles' synthesis. *Mol Biol Res Commun*, 2014, 3, 165-174.

Gupta R, Sharma M, Lakshmy R, Prabhakaran D, Reddy KS. Improved method of total antioxidant assay. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46, 126-129.

Horvat M. Utjecaj ciklodestrina na bioraspoloživost hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina iz ekstrakta komine masline. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.

Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, Baron M, Melcova M, Opatrilova R, Zidkova J, Bjorklund G, Sochor J, Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13, 2107-2128.

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou M, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 1-9.

Jain R, Jordan N, Weiss S, Foerstendorf H, Heim K, Kacker R, Hubner R, Kramer H, Hullebusch ED, Farges F, Lens PN. Extracellular polymeric substances govern the surface charge of biogenic elemental selenium nanoparticles. *Environ Sci Technol*, 2015, 49, 1713-1720.

Jug M, Vanić Ž. Presentacije iz kolegija Oblikovanje lijekova, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.

Karakterizacija mikro i nanočestica metodom dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, 2019., <https://www.irb.hr>, pristupljeno 11.4.2020.

- Khalil I, Yehye WA, Etxeberria AE, Alhadi AA, Dezfooli SM, Julkapli NB, Basirun BJ, Seyfoddin A. Nanoantioxidants: recent trends in antioxidant delivery applications. *Antioxidants*, 2020, 9, 1-20.
- Kim JH, Park EY, Ha HK, Jo CM, Lee WJ, Lee SS, Kim JW. Resveratrol-loaded nanoparticles induce antioxidant activity against oxidative stress. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29, 288-298.
- Lafka TI, Lazou AE, Sinanoglou VJ, Lazos ES. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem*, 2011, 125, 92-98.
- Leouifoudi I, Harnafi H, Ziad A. Olive mill waste extracts: polyphenol content, antioxidant, and antimicrobial activities. *Adv Pharmacol Sci*, 2015, 1-11.
- Leouifoudi I, Ziad A, Amechrouq A, Moulay A, Oukerrou MA, Mouse HA, Mbarki M. Identification and characterization of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Sci Technol*, 2014, 34, 249-257.
- Maiyo F, Singh M. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery. *Nanomedicine*, 2017, 12, 1075-1089.
- Majeed W, Zafar M, Bhatti A, John P. Therapeutic potential of selenium nanoparticles. *J Nanomed Nanotechnol*, 2018, 9, 1-4.
- Maleš Ž. Pojedine biljne vrste iz Biblije. *Farmaceutski glasnik*, 2014, 70, 9-10.
- Menon S, Agarwal H, Shanmugam VK. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles from an extract of ginger towards evaluation on anti-microbial and anti-oxidant activities. *Colloid Interfac Sci*, 2019, 29, 1-8.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ, Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 2001, 72, 145-171.
- Nigović B. Presentacije iz kolegija Analitika lijekova, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
- Orešković J, Ispitivanje utjecaja pomoćnih tvari na fizičku stabilnost suspenzije posakonazola. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
- Plantea, 2017., <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 11.4.2020.

Pravilnik o ekološkoj proizvodnji u uzgoju bilja i u proizvodnji biljnih proizvoda, 2001, Zagreb, Narodne novine, broj 91 (NN/91/2001).

Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods*, 2014, 18, 797-810.

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

Roig A, Cayuela ML, Sanches-Monedero MA. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag*, 2006, 26, 960-969.

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

Šestar baza podataka instrumenata za znanstvena istraživanja, 2020., <https://sestar.irb.hr/instrumenti>, pristupljeno 11.4.2020.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimationg antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 2006, 19, 669-675.

Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*, 2008, 13, 102-108.

Vyas JV, Rana S. Antioxidant activity and biogenic synthesis of selenium nanoparticles using the leaf extract of Aloe vera. *Int J Curr Pharm Res*, 2017, 9, 147-152.

Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA, Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100, 2555-2566.

Wee Tan H, Mo H, Lau AT, Xu Y. Selenium species: Current status and potentials in cancer prevention and therapy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 1-26.

Zhang W, Zhang J, Ding D, Zhang L, Muehlmann LA, Deng S, Wang X, Li W, Zhang W, Synthesis and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides capped selenium nanoparticles using tea extract. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018, 46, 1463-1470.

Zulueta A, Esteve MJ, Frígola MJ. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*, 2009, 114, 310-316.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Selen je esencijalni mikronutrijent i u organizmu je sastavni dio selenoproteina važnih za obranu od oksidacijskog stresa. Najbolji omjer učinkovitosti i sigurnosti ima nanoselen, kojeg je prilikom sinteze potrebno stabilizirati oblaganjem. U ovom radu je istraživana mogućnost primjene ekstrakta komine masline (EKM) kao sredstva za oblaganje u sintezi nanoselena. EKM je korišten u masenim udjelima od 0,3 % i 0,6 %, a karakteristike dobivenih nanočestica uspoređene su s onima dobivenim standardnim postupkom kemijske sinteze. Nanočesticama selena određena je raspodjela veličine čestica, zeta potencijal te je istražena njihova antiradikalna (ORAC i TEAC metoda) i reduktivna učinkovitost (Folin Ciocalteu metoda).

Dobiveni rezultati pokazali su da primjena EKM u biogenoj sintezi, u koncentraciji od 0,3 %, rezultira raspodjelom veličine čestica u rasponu od 100 nm – 200 nm, što je slično veličini čestica dobivenim standardnim postupkom kemijske sinteze. Povećanje udjela EKM značajno je povećalo srednji promjer čestica i širinu raspodjele veličina čestica. Zeta potencijal biogeno sintetiziranih nanočestica (-34 mV) pokazao je značajno veće apsolutne vrijednosti u odnosu na kemijske (-17,2 mV), iz čega je moguće pretpostaviti da, za razliku od polivinilpirolidona korištenog u kemijskoj sintezi, EKM stabilizira nastale nanočestice primarno putem elektrostatskih interakcija. Za razliku od kemijski sintetiziranih nanočestica, biogeno sintetizirane nanočestice pokazuju značajnu antiradikalnu (TEAC, ORAC) i reduktivnu (Folin Ciocalteu) učinkovitost (redom: 125 mg TE/L; 251 mg TE/L i 200 mg GAE/L).

## **SUMMARY**

Selenium is an essential micronutrient and it is important for defense against oxidative stress in the body as an integral part of selenoproteins. Nanoselenium has the best efficiency/safety ratio, but due to its tendency to agglomerate, it needs to be stabilized by coating during synthesis. In this paper, we investigated the possibility of using olive pomace extract (OPE) as a coating agent in the synthesis of nanoselenium. OPE was used at two concentration levels, 0.3 % and 0.6 %, and the characteristics of the obtained nanoparticles were compared with those obtained by a standard chemical synthesis. The characterization of obtained nanoparticles included determination of particle size distribution, zeta potential, antiradical (ORAC and TEAC method) and reductive capacity (Folin-Ciocalteu method).

Obtained results showed that the application of 0.3 % OPE in biogenic synthesis of nanoselenium results in a particle size distribution between 100 nm - 200 nm, which is similar to the particle size obtained by the standard chemical synthesis process. The increase of OPE concentration in reaction mixture significantly increased the mean particle diameter and the range of the particle size distribution. Zeta potential of biologically synthesized nanoparticles showed significantly higher absolute values (-34 mV) compared to chemical nanoselenium (-17.2 mV). Based on obtained data, it can be assumed that, unlike polyvinylpyrrolidone used in chemical synthesis, OPE stabilizes the nanoparticles primarily by electrostatic interactions. Unlike chemically synthesized nanoparticles, biologically synthesized nanoselenium showed significant antiradical (TEAC, ORAC) and reductive (Folin-Ciocalteu) efficacy (125 mg TE/L; 281 mg TE/L and 200 mg GAE/L, respectively).

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### MOGUĆNOSTI PRIMJENE EKSTRAKTA KOMINE MASLINE U SINTEZI NANOSELENA

**Laura Schauperl**

#### SAŽETAK

Selen je esencijalni mikronutrijent i u organizmu je sastavni dio selenoproteina važnih za obranu od oksidacijskog stresa. Najbolji omjer učinkovitosti i sigurnosti ima nanoselen, kojeg je prilikom sinteze potrebno stabilizirati oblaganjem. U ovom radu je istraživana mogućnost primjene ekstrakta komine masline (EKM) kao sredstva za oblaganje u sintezi nanoselena. EKM je korišten u masenim udjelima od 0,3 % i 0,6 %, a karakteristike dobivenih nanočestica uspoređene su s onima dobivenim standardnim postupkom kemijske sinteze. Nanočesticama selena određena je raspodjela veličine čestica, zeta potencijal te je istražena njihova antiradikalna (ORAC i TEAC metoda) i reduktivna učinkovitost (Folin-Ciocalteu metoda). Dobiveni rezultati pokazali su da primjena EKM u biogenoj sintezi, u koncentraciji od 0,3 %, rezultira raspodjelom veličine čestica u rasponu od 100 nm – 200 nm, što je slično veličini čestica dobivenim standardnim postupkom kemijske sinteze. Povećanje udjela EKM značajno je povećalo srednji promjer čestica i širinu raspodjele veličina čestica. Zeta potencijal biogeno sintetiziranih nanočestica (-34 mV) pokazao je značajno veće apsolutne vrijednosti u odnosu na kemijske (-17,2 mV), iz čega je moguće pretpostaviti da, za razliku od polivinilpirolidona korištenog u kemijskoj sintezi, EKM stabilizira nastale nanočestice primarno putem elektrostatskih interakcija. Za razliku od kemijski sintetiziranih nanočestica, biogeno sintetizirane nanočestice pokazuju značajnu antiradikalnu (TEAC, ORAC) i reduktivnu (Folin Ciocalteu) učinkovitost (redom: 125 mg TE/L; 251 mg TE/L i 200 mg GAE/L).

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

Rad sadrži: 41 stranica, 17 grafičkih prikaza, 6 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanoselen, biogena sinteza, komina masline, DLS, zeta potencijal, Folin-Ciocalteu, TEAC, ORAC

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**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 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

### POSSIBILITIES OF OLIVE POMACE EXTRACT APPLICATION IN BIOGENIC SYNTHESIS OF SELENIUM NANOPARTICLES

Laura Schauperl

#### SUMMARY

Selenium is an essential micronutrient and as an integral part of selenoproteins in the body it is essential for defense against oxidative stress. Nanoselenium has the best efficiency/safety ratio, but due to its tendency to agglomerate, it needs to be stabilized by coating during synthesis. In this paper, we investigated the possibility of using olive pomace extract (OPE) as a coating agent in the synthesis of nanoselenium. OPE was used at two concentration levels, 0.3 % and 0.6 %, and the characteristics of the obtained nanoparticles were compared with those obtained by a standard chemical synthesis. The characterization of obtained nanoparticles included determination of particle size distribution, zeta potential, antiradical (ORAC and TEAC method) and reductive capacity (Folin-Ciocalteu method). Obtained results showed that the application of 0.3 % OPE in biogenic synthesis of nanoselenium results in a particle size distribution between 100 nm - 200 nm, which is similar to the particle size obtained by the standard chemical synthesis process. The increase of OPE concentration in reaction mixture significantly increased the mean particle diameter and the range of the particle size distribution. Zeta potential of biologically synthesized nanoparticles showed significantly higher absolute values (-34 mV) compared to chemical nanoselenium (-17.2 mV). Based on obtained data, it can be assumed that, unlike polyvinylpyrrolidone used in chemical synthesis, OPE stabilizes the nanoparticles primarily by electrostatic interactions. Unlike chemically synthesized nanoparticles, biologically synthesized nanoselenium showed significant antiradical (TEAC, ORAC) and reductive (Folin-Ciocalteu) efficacy (125 mg TE/L; 281 mg TE/L and 200 mg GAE/L, respectively).

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

Thesis includes: 41 pages, 17 figures, 6 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanoselenium, olive pomace, biogenic synthesis, DLS, zeta potential, Folin-Ciocalteu, TEAC, ORAC

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.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2020.