

# Primjena pektina iz komine mandarine u zelenoj sinetezi nanoselena

---

**Predović, Nela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:163:386865>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

NELA PREDOVIĆ

Zagreb, 2021.

**Nela Predović**

**Primjena pektina iz komete mandarine u zelenoj  
sintezi nanoselena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo i asistenticama Kristini Radić i Nikolini Golub te svim djelatnicama Zavoda za kemiju prehrane Farmaceutsko–biokemijskog fakulteta na nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

1. UVOD.....	1
1.2. Pektini .....	2
1.2.1. Protopektin.....	3
1.2.2. Primjena i fiziološki učinci pektina.....	3
1.3. Nanočestice.....	4
1.3.1. Sinteza nanočestica .....	4
1.3.2. Primjena nanočestica.....	6
1.4. Selen.....	6
1.4.1. Selen u hranidbenom sustavu .....	7
1.4.2. Primjena nanočestica selena .....	8
1.4.3. Toksičnost nanočestica selena .....	9
1.4.4. Deficijencija selena .....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. Instrumenti i oprema .....	12
3.2. Kemikalije .....	12
3.2.1. Reagensi i otopine.....	13
3.3. Metode.....	13
3.3.1. Ekstrakcija pektina .....	13
3.3.2. Sinteza nanoSe.....	14
3.3.3. Čišćenje nanoselena postupkom dijalize .....	15
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nanoSe.....	16
3.3.5. Određivanje antiradikalnog potencijala TEAC metodom.....	17
3.3.6. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin- Ciocalteu metodom.....	19
3.3.7. Određivanje raspodjele veličine čestica nanoSe .....	20
3.3.8. Određivanje zeta potencijala nanoSe .....	21
3.3.9. Statistička analiza.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23

4.1. Određivanje koncentracije nanoSe u analiziranim uzorcima .....	23
4.2. Antiradikalni potencijal.....	24
4.3. Ukupni redukcijski potencijal.....	25
4.4. Veličina nanočestica .....	30
4.5. Zeta potencijal .....	36
5. ZAKLJUČCI .....	41
6. LITERATURA .....	42
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	46
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Mandarina

Mandarina je trajnozeleno biljka koja naraste do 2 ili 3 metra visine. Pripada porodici Rutvica i rodu Citrusa. Porijeklom je iz Kine. Mandarina cvate rano u proljeće, a plodovi sazrijevaju u jesen. Najbolje uspijeva uzgojem u suptropskim krajevima jer je posebno osjetljiva na niske temperature. Listovi mandarine su uski i duguljasti, za razliku od drugih vrsta citrusa. Plod mandarine je boba (*hisperidij*), narančaste ili crvene boje. Sastoji se od mesnatog dijela (*mezokarpa*) i kore (*perikarpa*). Mesnati dio sadrži sok slatko-kiselog okusa. U vanjskom dijelu kore mandarine nalaze se uljne žlijezde s eteričnim uljem koje mandarinama daje karakterističan miris. Kora citrusa koja zaostaje nakon dobivanja soka je glavni sastojak nusproizvoda i predstavlja gotovo 50% ukupne mase voća. Znanstveno je utvrđeno da mandarina zbog svog bogatstva vitamina i minerala ima mnoge zdravstvene dobrobiti. Mandarine sadrže i veći udio folata, željeza, kalija, magnezija i vitamine topljive u vodi. Od vitamina topljivih u vodi valja istaknuti vitamin C čija količina može zadovoljiti 80% potrebnog dnevnog unosa, ovisno o dnevnoj konzumaciji (Ferenčić i sur., 2016). Ostali antioksidansi prisutni u mandarini su beta-karoten te šezdesetak različitih flavonoida (najzastupljeniji su nobiliten i hisperidin).

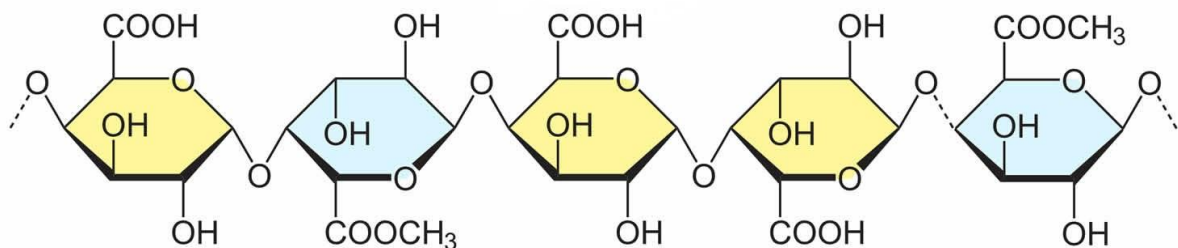
Mandarine prosječno sadrže 1.8 g vlakana na 100 g jestivog dijela ploda (Ferenčić i sur., 2016). Konzumacijom ploda ublažava se konstipacija, simptom iritabilnog kolona i regulira tjelesna masa. Dijetalna vlakna mandarine pojačavaju osjećaj sitosti. Dokazano je da *in vitro* mandarina kao namirnica inhibira rast bakterije *H. Pylori* (Li i sur., 2005). Zbog toga se preporuča njezino konzumiranje osobama koje imaju problema s gastritisom i ulkusom. Za djelovanje i učinkovitost zaslužan je flavonoid d-limonen (Li i sur., 2005).

Česta uprava mandarina je u proizvodnji sokova, gdje se nakon postupka ekstrakcije soka 50% ukupne mase mandarina odbacuje kao otpad odnosno komina. Komina mandarine najčešće se usmjerava na odlagalište bez predobrade. U novije vrijeme započinje se s korištenjem ostataka sušenih i fermentiranih mandarina u proizvodnji proteinskih i antioksidativnih nutriceutika (Nitayapat, 2013).

## 1.2. Pektini

Pektini su bijeli, amorfni ugljikohidrati velike molekulske mase koji se pojavljuju u zreloom voću (Valdéz i sur., 2015). Koriste se u proizvodnji voćnih želea, lijekova, u kozmetici, itd.

Pektini su prisutni u primarnoj staničnoj stijenci i središnjoj lameli mnogih biljaka te su često povezani s celulozom (protopektin), hemicelulozom i ligninskim strukturama (Valdéz i sur., 2015). Njihova prisutnost u stanici je bitna zbog njihovih esencijalnih funkcija kao što su adhezija između stanica te mehanička snaga stanične stijenke. Zbog toga imaju ključnu ulogu u rastu stanica biljke. Pektini spadaju u najkompleksniju skupinu polisaharida, s obzirom na kemijsku građu. Okosnica pektina sadrži molekule (1-4)- $\alpha$ -D-galakturonske kiseline povezane malim brojem ostataka ramnoze u glavnom lancu, te arabinoze, galaktoze i ksiloze u sporednim lancima (Valdéz i sur., 2015).



Slika 1. Okosnica pektina (preuzeto s [www.healtjade.net](http://www.healtjade.net))

Pektinski polisaharidi se mogu podijeliti na tri tipa: homogalakturonan, ramnogalakturonan I i ramnogalakturonan II. Homogalakturonan (HG) je linearni polimer izgrađen od D-galakturonske kiseline. Ovisno o reakcijama acetilacije ili metilacije koje se događaju tijekom polimerizacije, može se podijeliti u tri skupine: HG s više od 75% metiliranih karboksilnih skupina, HG s manje od 75% metiliranih karboksilnih skupina te HG bez metiliranih karboksilnih skupina. Ramnogalakturonan I (RGI) je izgrađen od ponavljajućih disaharida ramnoze i galakturonske kiseline acetilirane i povezane sa sporednim lancima neutralnih šećera, kao što su galaktoza, arabinoza i ksiloza. Ramnogalakturonan II (RGII) također je građen od homogalakturonanskih lanaca, ali s vrlo kompleksnim sporednim skupinama koje su vezane na 12 različitih tipova glikozilnih ostataka, kao što su rijetke vrste šećera, npr. 2-O-metil ksiloza, 2-O-metil fukoza, 2-keto-3-deoksi-D-likso heptuloza kiselina, 2-keto-3-deoksi-D-mano oktuloza kiselina (Valdéz i sur., 2015).



### 1.2.1. Protopektin

Protopektin je spoj celuloze i pektinskih molekula (Yeoh i sur., 2007). Visoke koncentracije vodikovih iona prisutnih u otapalu (pri niskom pH) dovode do hidrolize netopljivog protopektina. Tijekom kisele hidrolize, protopektin se razgrađuje na topljivi pektin i celulozu eliminacijom molekula vode. Prisutnost polivalentnih iona kao što su kalcij i magnezij povećavaju netopljivost protopektina. Utvrđeno je da se najveća količina topljivog pektina dobije pri ekstrakciji ispod pH 2.0 (Yeoh i sur., 2007). Alkalni uvjeti kidaju veze između pektinskih molekula i stanične stijenke na sličan način kao i kiselina otapala. Međutim, alkalni uvjeti uzrokuju nestabilnost okosnice pektinskih molekula (galakturonske kiseline) i, posljedično tome, dolazi do ireverzibilne razgradnje pektina. Rezultat razgradnje pektinskih molekula je taj da se ekstrahirani pektin ne može taložiti s alkoholom (Yeoh i sur., 2007).

### 1.2.2. Primjena i fiziološki učinci pektina

Pektini su prirodni, biokompatibilni, biorazgradivi polisaharidi. Koriste se kao emulgatori, sredstva za geliranje, stabilizatori te zgušnjivači; jednim su nazivom reološki modifikatori. U svim ovim slučajevima, galakturonski ostaci trebaju prije biti modificirani dodatkom metilnih skupina (Valdes i sur., 2015). Ova kemijska modifikacija je nužna kako bi poboljšala fizička svojstva pektina, koja ovise o njihovoj molekularnoj masi i stupnju metil-esterifikacije (DM) (računa se kao molovi metanola na 100 molova galakturonske kiseline). Mogu biti postignuta dva različita DM stupnja: pektini s visokim DM (HM pektini) koji sadrže 50% ili više galakturonskih ostataka i pektini s niskim DM (LM pektini) koji sadrže manje od 50% galakturonskih ostataka, najčešće 20 - 30% (Valdes i sur., 2015). Različiti DM stupanj rezultira različitim primjenama pektina. HM pektini se koriste kao gelirajuća sredstva u proizvodnji pekmeza, u konzervansima za voće i sokove, želeima, mliječnim proizvodima, nekim kolačima i bezalkoholnim pićima. HM pektini formiraju gelove hidrofobnim interakcijama pri kiselom pH u vodenom mediju s visokim sadržajem šećera. LM pektini se koriste za pripremu gelova pri nižim pH vrijednostima u prisutnosti kontroliranih količina kalcija ili ostalih dvovalentnih kationa. Formiraju gelove neovisno o sadržaju šećera. Koriste se u industriji hrane uključujući proizvodnju pekmeza, želea s niskim udjelom šećera, mliječnih proizvoda, voćnih sladoleda, kao ugušćivači sirupa za konzerviranje voća i povrća itd. Što je DM manji, to će takvi pektini biti brže hidrolizirani. To će zatim utjecati na čvrstoću gela, te će gel postati manje čvrst (Valdes i sur., 2015). Tiwari i sur. (2017) su u svom radu pokazali da stupanj esterifikacije ovisi o pH te veličini sita. Oni su koristili prašak kore slatke naranče

te ga prosijali na 3 različite veličine sita: 16, 32 i 60 mm. Pri ekstrakciji pektina koristili su otopine limunske kiseline pripremljene s različitim pH vrijednostima 1.0, 1.5, 2.0 i 2.5. Pokazalo se da se LM pektini formiraju pri  $\text{pH} < 2.0$ , a HM pektini pri  $\text{pH} > 2.0$ . Također, zaključeno je da se prinos pektina povećava smanjenjem pH i smanjenjem veličine sita, odnosno smanjenjem veličina čestica praška.

Pokazalo se da konzumacija pektina dovodi do smanjenja razine kolesterola u krvi (Tiwari i sur., 2017). U debelom crijevu i kolonu, mikroorganizmi razlažu pektin i oslobađaju kratkolančane masne kiseline koje apsorbiraju i inhibiraju *de novo* sintezu kolesterola u jetri. Također, pektini smanjuju i razinu glukoze u krvi, smanjuju pojavu tumorskih oboljenja te stimuliraju imunski odgovor (Tiwari i sur., 2017). Znanstvenici su pronašli jedno od mogućih objašnjenja zašto ljudi koji jedu više voća i povrća općenito manje obolijevaju od karcinoma. Osim dokazanih povoljnih učinaka ostalih komponenata voća i povrća, pokazali su da se fragment oslobođen od pektina, koji se nalazi u svom voću i povrću, veže i vjeruje se da tako inhibira galektin 3 (Gal3), protein koji igra ulogu u svim fazama progresije karcinoma. Povišene razine galektina-3 povezuju se s upalom srca i zloćudnim tumorima (Tiwari i sur., 2017).

### 1.3. Nanočestice

Nanočestice su čestice veličine promjera u rasponu od 1 do 100 nanometara. U nanotehnologiji, čestica se definira kao mali objekt koji se ponaša kao cjelina u odnosu na transport i svojstva (Sharmin i sur., 2021). Uglavnom se koriste kao sustavi za dostavu lijekova jer se njihova veličina i karakteristike površine mogu lako mijenjati i prilagođavati te se na taj način može postići i pasivna i aktivna ciljano isporuka lijekova (Tendo i sur., 2013). One mijenjaju distribuciju i klirens lijekova te se postiže povećanje terapijskog djelovanja lijekova i smanjenje nuspojava. Trenutan rastući interes za nanostrukture rezultat je i brojnih potencijalnih primjena u područjima biomedicine, optike, elektornike, magnetizma, elektrokemije itd. (Tendo i sur., 2013).

#### 1.3.1. Sinteza nanočestica

Dvije su osnovne metode za sintezu nanočestica: *bottom-up* sinteza koja označava sintezu nanočestica počevši od manjih komponenti poput atoma i molekula te *top-down* sinteza što je sinteza nanočestica iz makroskopskih materijala (Banica, 2021).

Gledano iz drugog aspekta, sinteza nanočestica može se podijeliti u tri grupe: fizikalne, kemijske i biološke metode. Fizikalne i kemijske metode vrlo su skupe. Kod bioloških metoda sinteze nanočestica nisu potrebni tako ekstremni uvjeti kao kod fizikalnih i kemijskih metoda te je cijena provedbe sinteze znatno manja (Ingale i Chaudhari, 2013). Biološke metode i zelene sinteze nanočestica omogućavaju ekološki prihvatljiv, niskotoksičan, ekonomski prihvatljiv i učinkovit način za proizvodnju nanočestica. Ove metode koriste biološke sustave kao što su bakterije, plijesni, virusi, gljivice te ekstrakte biljaka.

Kemijske metode sinteze nanočestica su korisne kada je potrebno u kratkom periodu sintetizirati veliku količinu nanočestica. U ovim metodama su potrebna sredstva za stabilizaciju nanočestica. Najčešće korišteni reducensi u ovom tipu sinteze su borhidrid, citrat, askorbat i elementarni vodik. Neki kemijski reagensi korišteni kod ove metode sinteze i stabilizacije nanočestica su toksični i dovode do nastajanja nusprodukata koji nisu ekološki prihvatljivi (Ingale i Chaudhari, 2013). Kemijske metode koje se uobičajeno koriste za sintezu nanočestica su sol-gel postupak, mikroemulzijske tehnike, hidrotermalna sinteza, poliol sinteza te sinteza kemijskim parama (Banica, 2021).

Fizikalne metode koriste termalnu energiju, mehanički tlak, radijaciju visoke energije ili električnu energiju koja uzrokuje abraziju, taljenje, isparavanje i kondenzaciju materijala za stvaranje nanočestica (Banica, 2021). Uglavnom se koristi *top-down* pristup, a prednost je što je u takvim metodama smanjena kontaminacija otapalom. Međutim nastaje velika količina otpada te su iz tog razloga ove metode manje ekonomične. Primjeri metoda su kuglično mljevenje visokom energijom (mehanokemijska sinteza), elektroraspršivanje, kondenzacija inertnim plinom, laserska piroliza te miješanje uz taljenje (Banica, 2021).

Postoji mnogo prirodnih izvora za biološku sintezu nanočestica: biljke, gljive, kvasci, bakterije itd. Zapravo, jednostanični i multikulturalni organizmi imaju sposobnost sinteze unutar- i izvanstaničnih anorganskih nanočestica (Ingale i Chaudhari, 2013). Korištenje biljaka u sintezi nanočestica privuklo je veće zanimanje znanstvenika jer omogućuju postupak biosinteze u jednom koraku. Također, protokoli koji uključuju biljne izvore ne sadrže toksične tvari čime se otvara bolja mogućnost sinteze. Nadalje, sredstva za stabilizaciju su već prisutna u biljkama što dodatno olakšava sam proces sinteze. Sinteza nanočestica uz korištenje bakterija se u prošlim godinama značajno povećala zbog sve veće primjene nanočestica, npr. *Bacillus species* je opisan u sintezi metalnih nanočestica te su istraživači pokazali sposobnost ovih bakterija da izrađuju izvanstanične nanočestice, veličine 10 - 20 nm (Ingale i Chaudhari, 2013). Biološka sinteza nanočestica uz korištenje gljiva je primarna u današnje vrijeme zbog

niske toksičnosti, visoke bioakumulacije, jednostavne sinteze, prerade i rukovanja biomasom. Naposljetku, biološke čestice kao što su virusi, proteini, peptidi i enzimi, mogle bi se također koristiti u sintezi nanočestica (Ingale i Chaudhari, 2013).

### 1.3.2. Primjena nanočestica

Područje primjene nanočestica iznimno je široko: farmaceutika, kozmetika, hrana i piće, poljoprivreda itd. Nanočestice se razmatraju kao potencijalne antimikrobne tvari, na primjer nanočestice srebra pokazale su jaki baktericidni potencijal protiv Gram - pozitivnih i negativnih bakterija. Također se istražuje i njihov baktericidni potencijal na MDR (*multidrug resistant*) bakterije (Ingale i Chaudhari, 2013).

Nanočestice se primjenjuju i u medicini i zdravstvu. Upotrebljavaju se u razvoju tehnika za *in vivo* dijagnostiku biomedicinskih poremećaja. Trenutno se nanočestice željezovog oksida uspješno primjenjuju u dijagnostici i terapiji s manje neželjenih učinaka (Ingale i Chaudhari, 2013). Također je razvijen izrazito osjetljiv i točan imunotest koji se temelji na agregaciji nanočestica zlata, koje su obložene proteinskim antigenima, u prisutnosti njihovog antitijela (Ingale i Chaudhari, 2013). Nanočestice, kao sustavi dostave lijekova, u stanju su poboljšati nekoliko bitnih svojstava slobodnog lijeka, kao što su topljivost, stabilnost, farmakokinetika, bioraspoloživost i učinkovitost. Upravo zbog toga, korištenje nanočestica u kozmetici te kao sredstva za oblaganje lijekova povećava se iz dana u dan. Nadalje, metalni oksidi u nanočesticama, kao što su cinkov oksid i titanijev dioksid, pojavljuju se sve više kao komponente kućanskih proizvoda, u kremama za sunčanje, pastama za zube i lijekovima (Ingale i Chaudhari, 2013).

### 1.4. Selen

Selen je element periodnog sustava elemenata atomskog broja 34 i atomske mase 78.96. Kemijski je srodan ostalim elementima halogene skupine, uključujući kisik (O), sumpor (S), telurij (Te) i polonij (Po). Svrstava se u skupinu polumetala, odnosno metaloida (El-Ramady i sur., 2014). Pojavljuje se u različitim anorganskim oblicima kao selenat ( $SeO_4^{2-}$ ) i selenit ( $SeO_3^{2-}$ ), gdje su mu oksidacijska stanja +6, odnosno +4. Jedan je od najvažnijih esencijalnih elemenata u tragovima zbog svog antioksidativnog, ali i prooksidativnog djelovanja (katalizira oksidaciju tiola i istovremeno stvaranje superoksida koji mogu oštetiti stanične komponente) zbog čega ima veliku ulogu u prehrani i medicini (Wang i sur., 2007). Antioksidativni, odnosno prooksidativni učinak te bioraspoloživost i

toksičnost selena ovise o njegovom kemijskom obliku. Selenometionin (SeMet) je najzastupljeniji organski oblik selena u hrani. Osim selenometionina, manje prisutan organski oblik selena je i selenocistein. Elementarni Se redoks potencijala 0, pojavljuje se najviše u sedimentnim stijenama, iako je rijedak u prirodi. Od tri alotropa elementarnog Se, sivi i crni nisu topljivi i biološki su inertni. Crveni alotrop proizvode mnoge bakterije iz selenita. Utvrđeno je da crveni elementarni Se u nano dimenzijama očituje nova svojstva (El-Ramady i sur., 2014). SeMet zajedno s nanoSe ima nižu toksičnost od selenita dok nanoSe ima manju toksičnost a jednaku učinkovitost u povećanju aktivnosti selenoenzima u usporedbi sa SeMet (Wang i sur., 2007).

Selen je jedan od elemenata s najužim rasponom između razine unosa koja dovodi do pojave deficita (40 µg/dan) i gornje granice unosa (400 µg/dan) (Kapur i sur., 2017). Ima važnu ulogu u staničnom metabolizmu, esencijalna je komponenta enzima koji štite organizam od slobodnih radikala te je bitan za pravilnu funkciju štitnjače i dr. Mnoge stabilne organske komponente Se uspješno su sintetizirane te se koriste kao antioksidansi, inhibitori enzima, protutumorska i protuupalna sredstva, induktori citokina i imunomodulatori (Kapur i sur., 2017).

Najvažnija uloga selena je povezana s njegovom prisutnošću u glutathion peroksidazi (GPx) i tioredoksin reduktazi (TrxR). GPx katalizira redukciju vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida koristeći glutathion (GSH) kao proton donor. TrxR vrši antioksidativno djelovanje katalizirajući redukciju oksidiranog tioredoksina koristeći NADPH kao elektron donor. Također, TrxR posjeduje i brojne druge antioksidativne funkcije kao što je redukcija spojeva koji sadrže selen, regeneracija askorbil radikala, lipoične kiseline i ubikvina te direktno uklanjanje lipidnih i vodikovih peroksida (Wang i sur., 2007).

#### **1.4.1. Selen u hranidbenom sustavu**

Adekvatan unos selena može se ostvariti putem hrane. Selen je u hrani najviše prisutan u obliku vezanom za proteine u biljnim i životinjskim tkivima (El-Ramady i sur., 2014). Dakle, meso, morski plodovi i žitarice smatraju se najvažnijim izvorima Se jer imaju visokoproteinski sastav (za meso i morske plodove 0.3 – 0.5 mg Se/kg), odnosno zbog njihove velike konzumacije (za žitarice 0.1 – 10 mg Se/kg) (El-Ramady i sur., 2014). Voće i povrće, koje je relativno niskoproteinska hrana, ima nizak udio Se (< 0.01 mg Se/kg). Općenito, sadržaj Se u različitim hranidbenim sustavima ovisi i u isto vrijeme odražava dostupnost raspoloživog Se u zemlji.

Biljke koje sadrže selen mogu se podijeliti u dvije opće kategorije: one biljke koje akumuliraju Se proporcionalno količini raspoloživog Se iz zemlje (npr. pšenica) te one biljke koje aktivno akumuliraju Se u redovima veličina većima od koncentracije Se u samoj zemlji (npr. *Astragalus spp.*) (Kapur i sur., 2017). Različite biljne vrste često sadrže različite kemijske oblike selena što često određuje samu njegovu bioaktivnost. Ključan enzim za sintezu većine metiliranih kemijskih oblika selena je selenocistein-specifična metiltransferaza (Kapur i sur., 2017). U nekim biljkama, povišene razine Se potiskuju koncentraciju dušika (N), sumpora (S) i fosfora (P), kao i nekoliko aminokiselina. Pri visokoj koncentraciji selena može doći i do inhibicije apsorpcije nekih metala (većinom Cu, Cd, Mn i Zn) (Kabata-Pendias, 2011). Stoga, poznato je da primjena N, S i P pomaže u detoksifikaciji selena, što može biti rezultat ili smanjenja apsorpcije selena korijenjem ili uspostavljanje ispravnog omjera selena i navedenih elemenata.

Izvješteno je da globalni unos Se ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ ) značajno varira među državama. Također, utvrđeno je da se dnevni unos Se kreće između 7 do 4 990  $\mu\text{g}/\text{dan}$ , sa srednjim vrijednostima od 40  $\mu\text{g}/\text{dan}$  u Europi te 93 do 134  $\mu\text{g}/\text{dan}$  u SAD-u (El-Ramady i sur., 2014). Konačno, donesene su preporuke dnevnog unosa Se koje iznose 60 i 53  $\mu\text{g}/\text{dan}$  za muškarce odnosno žene (El-Ramady i sur., 2014).

#### 1.4.2. Primjena nanočestica selena

Nanočestice osiguravaju veću bioraspoloživost lijekova i također služe kao sredstva za ciljanu dostavu lijekova na mjesto djelovanja. To se postiže prije svega zbog njihove velike površine. Eksperimentalno je dokazano da su nanočestice pokazale nove karakteristike transporta te veću učinkovitost apsorpcije (Kapur i sur., 2017).

Različiti oblici selena, uključujući neke oblike soli te organski selen, korišteni su u proučavanju njegovog biološkog djelovanja prije nekoliko godina, a od nedavno se nanočestice elementarnog selena ( $\text{Se}^0$ ) istražuju kao mogući oblik ovog djelotvornog elementa. Međutim, trenutno ima vrlo malo podataka o intestinalnoj apsorpciji i retenciji selena u tom obliku (Kapur i sur., 2017).

NanoSe je svijetlo crvene boje, topljiv u vodi i visoko stabilan. Proizvodi se za uporabu u dodacima prehrani, ali se razvija i za primjenu u farmakoterapiji. Utvrđeno je da nanoSe ima usporedivu djelotvornost sa selenitom u selenoenzimima i razinama Se u tkivima, ali je manje toksičan. Ovi rezultati ukazuju da nanoSe može služiti kao antioksidans sa smanjenim rizikom od toksičnosti (Kapur i sur., 2017). NanoSe ima također protutumorsko

djelovanje, posebno kod raka prostate, kolona i pluća (Kirupagaran i sur., 2016). Utvrđeno je da je nanoSe sposoban inhibirati rast stanica uz način ovisan o dozi. Također, kombinacija nanoSe i citostatika doksorubicina pokazuju učinkovitije protutumorsko djelovanje nego terapija samo doksorubicinom (Kirupagaran i sur., 2016).

### 1.4.3. Toksičnost nanočestica selena

Budući da manje nanočestice imaju veću površinu i broj čestica po jedinici mase, u usporedbi s većim česticama mogu dovesti i do štetnih posljedica. Toksikološka istraživanja su pokazala da nanočestice uzrokuju štetne učinke na zdravlje dišnih puteva, uzrokujući više upala u usporedbi s većim česticama istih tvari (Pan i sur., 2009). Tijelo će reagirati različito na dozu koja sadrži bilijun nanočestica u usporedbi s istom dozom koja sadrži nekoliko mikročestica. Što je veća površina, veća je i reaktivnost, a to dovodi do povećanog izvora reaktivnih kisikovih spojeva, što je pokazano u *in vitro* ispitivanjima (Pan i sur., 2009).

Pretpostavlja se da toksičnost nanočestica dijelom ovisi i o njihovoj veličini, jer je primijećeno da je učinkovitost makrofaga veća u slučaju većih čestica u usporedbi s manjima (Kapur i sur., 2017). To dovodi do smanjene toksičnosti agregata nanočestica većih od 100 – 200 nm. Visoke koncentracije nanočestica potaknut će agregaciju te će to posljedično uzrokovati smanjene toksične učinke u usporedbi s niskim koncentracijama nanočestica (Kapur i sur., 2017).

Selen se u koncentracijama višim od 1 mg/kg smatra toksičnim za većinu biljaka jer se akumulira u tkivu biljaka i negativno utječe na stanični mehanizam. Utvrđeno je da biljke koje rastu na zemlji prezasićenoj selenom pokazuju smanjen rast i manje plodova. Uslijed fitotoksičnosti selena dolazi do stvaranja oksidativnog stresa i metaboličkih abnormalnosti kao što je zamjena sumpora selenom u proteinima i drugim molekulama što rezultira njihovim funkcionalnim oštećenjem (Feng i Wei, 2012). U detoksifikacijske mehanizme uključeni su metalotionein, tioli, glutation-S-transferaza čija se aktivnost povećava pri nižim koncentracijama selena, dok je kod prekomjernih koncentracija selena izrazito smanjena. Pri niskim koncentracijama Se, porast aktivnosti navedenih molekula vjerojatno smanjuje toksične učinke selena njegovom konjugacijom i/ili neutralizacijom reaktivnih kisikovih spojeva nastalih uslijed oksidativnog stresa uzrokovanog selenom. Pri visokim koncentracijama Se, svi ovi mehanizmi vjerojatno podbacuju ili postaju ograničeni zbog cjelokupne stanične metaboličke disfunkcije, što može ometati rast biljaka (Feng i Wei, 2012).

Unos seleno u dozama višim od 350 - 400 µg/dan može dovesti do pojave toksičnosti seleno ili selenoze u ljudi i životinja. Nakon ingestije 17.2 µg/mL Se uslijed netočnog doziranja u hrani za životinje, svinje su pokazale znakove akutnog trovanja selenom, uključujući paralizu, pojačanu osjetljivost na dodir, nedostatak apetita, i drhtanje (Kapur i sur., 2017). Znakovi akutne selenoze uključuju nedostatak apetita, srednje jake konvulzije i smanjenu tjelesnu temperaturu. Simptomi kronične selenoze uključuju gubitak dlaka, deformacije ili pukotine na koži, rogovima i kopitima kod životinja, zbog čega životinje lupaju kopitima i teturaju (Kapur i sur., 2017). Kod ljudi, znakovi selenoze uključuju zadah po češnjaku, gubitak kose, stanjene i krhke nokte, deformacije zubi, lezije na koži i smanjene razine hemoglobina nakon unosa 5 mg/dan Se (Kapur i sur., 2017).

#### 1.4.4. Deficijencija seleno

Anorganski oblici seleno učinkovito povećavaju razinu seleno u biljnim usjevima te sprječavaju bolesti uzrokovane deficijencijom Se kod ljudi koji ih konzumiraju. Stoga je važno razumjeti učinak suplementacije selenitom i selenatom u usjevima. Biljke učinkovitije apsorbiraju selenat, što je očitovano većom koncentracijom seleno u biljkama suplementiranim selenatom u usporedbi s onima suplementiranim selenitom, ali selenit može biti sigurniji za upotrebu u gnojivima zbog manje štetnih učinaka kod primjene visokih koncentracija. Kako bi se bolje liječila deficijencija seleno, a istovremeno prevenirala toksičnost, potrebna je točna procjena učinaka anorganskih spojeva Se u gnojivima. Pašnjaci obogaćeni selenitom i selenatom, kao i soli za lizanje kod stoke, također su korištene metode povećanja selenskih koncentracija u stočarstvu. Stoga je također važno razumjeti učinke suplementacije životinja te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se optimirali postojeći režimi suplementacije anorganskim selenom (Kapur i sur., 2017).

Kod ljudi, deficijencija Se uzrokuje slabiji imunski odgovor smanjujući broj T-limfocita te njihovu proliferaciju (Look i sur., 1997). Studije su pokazale da suplementacija natrijevim selenitom u dozi od 200 µg/dan u periodu dužim od 8 tjedana rezultira pojačanim odgovorom T-limfocita (Redman i sur., 1998). Kod pacijenata s AIDS-om, deficijencija Se povezuje se sa smanjenim brojem imunskih stanica, visokim stopama progresije bolesti i povećanim rizikom od smrti. Također, utvrđeno je da Se štiti stanice od oksidativnog stresa, što rezultira smanjenjem progresije bolesti kod kojih se oksidativni stres nalazi u podlozi (Redman i sur., 1998).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U proizvodnji svježih sokova od mandarine čak 50% ukupne biomase zaostaje kao komina te njezino odlaganje u okoliš doprinosi ukupnoj količini otpada i značajno povećava ekološki otisak proizvodnog procesa. Naime, zbog značajnog organskog opterećenja odlaganje komine mandarine u okoliš dovodi do promjena mikrobiološkog sastava tla i oslobađanja nitrata, sulfata i fosfata u tlo i podzemne vode. Predobradom, koja dovodi do smanjenja količine organske tvari u otpadu, umanjuje se njezova ekotoksičnost te se otvara mogućnost stvaranja proizvoda dodane vrijednosti.

Među organskim spojevima koji su u značajnom postotku prisutni u komini mandarine važno je izdvojiti pektin kojeg je zbog specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava moguće koristiti kao inkapsulacijsko sredstvo u oblikovanju nutriceutika.

Zbog varijabilnih količina selena u tlu i hrani, suplementacija selenom često se preporučuje u ljekarničkoj praksi, osobito pacijentima kod kojih je cilj poboljšati aktivnost imunološkog sustava i pacijentima sa autoimunim bolestima štitnjače. Na tržištu je prisutno više oblika nanoselena, a sve ih karakterizira uska terapijska širina. Neka istraživanja ukazuju na činjenicu da nanoselen ima drugačija farmakokinetička svojstva od uobičajenih anorganskih soli i organskog selena te se sve više istražuje njezova moguća primjena kao nutriceutika.

Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je razvoj postupka zelene sinteze nanoselena primjenom različitih pektinskih frakcija izoliranih iz komine mandarine. Razvojem zelenih procesa sinteze nanoselena smanjuje se ekološki otisak procesa proizvodnje nanoselena, a nastale nanočestice po svojim karakteristikama mogu se razlikovati od onih dobivenih kemijskom sintezom što može rezultirati poboljšanim fizikalno-kemijskim karakteristikama i biološkim učincima.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Instrumenti i oprema

- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Indija)
- Soxhlet aparatura (Inko, Hrvatska)
- pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Metrohm, Švicarska)
- Vortex mješalica, tip VTX-3000L (Mixer UZUSIO, Japan)
- Sušionik (Inko, Hrvatska)
- Magnetska mješalica, MIX 15 eco (2mag AG, Njemačka)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VICTOR X3 (Perkin Elmer, SAD)
- PC računalo te softveri Microsoft Excel i GraphPad Prism 9
- Dijalizijska membrana, D9527-100FT, MWCO 14 000 Da (Sigma-Aldrich, SAD)
- Mikrotitarska ploča s 96 jažica
- posuđe i pribor: pipete (automatske: jednokanalna i multikanalna, staklene), elenmayerove tikvice, okrugle tikvice s ravnim dnom, boca za odsisavanje, lijevci, štapići, žlice, špatule, falcon kivete...

### 3.2. Kemikalije

- ekstrakt kome mandarine
- Limunska kiselina 1-hidrat (Gram-mol, Hrvatska)
- 96%-tni etanol (Gram-mol, Hrvatska)
- Askorbinska kiselina (Gram-mol, Hrvatska)
- Natrijev selenit (Sigma-Aldrich, SAD)
- Komercijalni pektin (Pectin E440, Esarom, Austrija)
- Voda – predestilirana, pročišćena i deionizirana, otpor manji od 18,2 M $\Omega$  pri 25 °C i ukupne masene koncentracije organskog ugljika < 5  $\mu$ g/L
- Folin-Ciocalteu fenol reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol – ABTS (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev karbonat bezvodni, p.a. (Lach-Ner, Češka)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, SAD)

- Polivinilpirolidon (Sigma-Aldrich, SAD)

### 3.2.1. Reagensi i otopine

Izrada 1 M L-askorbinske kiseline: izvagano je 3.524 g L-askorbinske kiseline i otopljeno u 20 mL vode.

Izrada 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ : izvagano je 345.8 mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  i otopljeno u 20 mL vode.

Izrada 0.05% pektina (sirovi, pročišćeni i kupovni): izvagano je 15 mg pektina direktno u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 ml i otopljeno u 30 mL vode. Zatim su stavljeni na magnetsku mješalicu na 1200 okretaja i ostavljeni preko noći.

Izrada 1% PVP: izvagano je 200 mg PVP-a i otopljeno u 20 mL vode.

## 3.3. Metode

### 3.3.1. Ekstrakcija pektina

Istraživanja su provedena na uzorku komine mandarine (*Citrus reticulata*, Rutaceae). Komina mandarine je osušena i usitnjena te prosijana na veličinu čestica 0.8 mm. Dobiveni prašak potom je odmašćen petroleterom u Soxhlet uređaju s ciljem uklanjanja masne komponente uzorka.

Ekstrakcija pektina provedena je s 200 mL 1% limunske kiseline (pH=1.5), protresanjem kroz 2 h na 85°C. Početne težine uzoraka iznosile su 9.96 g za prvi uzorak, 9.94 g za drugi te 10.10 g za treći uzorak. Ekstrakcija je provedena u Erlenmayerovoj tikvici (300 mL), zatvorenoj alu-folijom. Po završetku ekstrakcije reakcijska smjesa je filtrirana kroz filter papir i gazu te zatim ostavljena u hladnjaku preko noći. Pektin je istaložen iz dobivenog filtrata dodatkom 400 mL 96%-tnog etanola. Nakon dodatka etanola otopina se miješala na magnetskoj mješalici 2 h, a zatim stajala u hladnjaku na 4°C 1 h. Nakon toga je slijedila vakuum filtracija preko Büchnerovog lijevka te se iz smjese izdvojio sirovi pektin. Trećina sirovog pektina se dodatno isprao 63%-tnim etanolom u svrhu uklanjanja preostalih topljivih nečistoća te se na taj način dobila frakcija pročišćenog pektina. Sirovi i pročišćeni pektin su se prebacili u Petrijeve zdjelice i sušili na sobnoj temperaturi. Dobivena masa sirovih pektina iznosila je 2.28 g dok je masa pročišćenih pektina iznosila 0.74 g.

### 3.3.2. Sinteza nanoSe

U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL doda se pročišćena voda, određen volumen 0.2% otopine pektina i miješa se 15 min na magnetskoj miješalici. Nakon toga se doda određen volumen 1M L- askorbinske kiseline pa, kap po kap, 0.1 M otopina natrijeva selenita brzinom 1 kap/2 sek. Već tijekom dodavanja otopina mijenja boju u crvenu zbog redukcije selenita i nastajanja  $Se^0$ . Nakon dodatka ukupnog volumena  $Na_2SeO_3$  otopina se miješa na magnetskoj miješalici još 20 min. Osim pektina kao sredstvo za oblaganje u izradi referentnog uzorka (kemijska sinteza nanoselena) korišten je i polivinilpirolidon (PVP) u koncentraciji 0.1%. Sastav reakcijskih smjesa prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav različitih reakcijskih smjesa korištenih u sintezi nanočestica selena

naziv uzorka	$Na_2SeO_3$ /mL	L-askorbinska kis. / mL	PMr / mL	PMp / mL	P / mL	PVP / mL	voda / mL	Vtot / mL	w pektina (%)
PMr1	0,5	0,5	2,9				10,6	14,5	0,01
PMr2	0,5	0,5	5,8				7,7	14,5	0,02
PMp1	0,5	0,5		2,9			10,6	14,5	0,01
PMp2	0,5	0,5		5,8			7,7	14,5	0,02
P1	0,5	0,5			2,9		10,6	14,5	0,01
P2	0,5	0,5			5,8		7,7	14,5	0,02
PVP	0,5	0,5				1,45	12,05	14,5	0,1
PMr3	1	1	7,5				19,5	29	0,05
PMr4	1	1	15				12,0	29	0,1
PMr5	1	1	26,5				0,5	29	0,18
PMp3	1	1		7,5			19,5	29	0,05
PMp4	1	1		15			12,0	29	0,1
PMp5	1	1		26,5			0,0	29	0,18
P3	1	1			7,5		19,5	29	0,05
P4	1	1			15		12,0	29	0,1
P5	1	1			26,5		0,0	29	0,19

PMr1–uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%;  
 PMr2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%;  
 PMp1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije

0.01%; PMp2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%; P1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%; P2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%; PVP-uzorak sintetiziranog nanoSe uz PVP kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%; PMr3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%; PMr4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%; PMr5-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.18%; PMP3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%; PMP4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%; PMP5-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.18%; P3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%; P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%; P5-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.19%

PMr-sirovi pektini mandarine; PMP-pročišćeni pektini mandarine; P-kupovni pektini

### 3.3.3. Čišćenje nanoselena postupkom dijalize

Nakon sinteze, reakcijska smjesa podvrgnuta je dijalizi kako bi se sintetizirani nanoselen odvojio od neizreagirane selenitne frakcije, suviška L-askorbinske kiseline i pektina.

Prije uporabe, dijalizijske membrane potrebno je držati namočene u vodi kroz 3-4 sata kako bi se uklonili tragovi glicerola (voda se mijenjala 3 puta). Zatim se membrana izreže na manje dijelove, svaki dužine oko 14 cm, te se svaki dio narola i pričvrsti s jedne strane štipaljkom. U membranu se doda 30 mL suspenzije nanoSe te se i gornji dio membrane zarola i pričvrsti štipaljkom. Dijalizijske membrane se pričvrste nosačem uz rub čaše kako bi sve bile otprilike jednako udaljene od magnetske miješalice i potpuno uronjene u vodu. Čišćenje dijalizom se provodi preko noći na magnetskoj miješalici u čašama zapremnine 1000 mL u otprilike 900 mL vode. Voda se mijenja najmanje 3 puta – prvi put nakon 30 min do 3 sata, drugi put nakon 4-5 sati i treći put nakon 12 sati. U postupku su korišteni veliki magnetski mješači (1.5 cm). Nakon dijalize otopina nanoSe se prebaci iz dijalizijskih membrana u Falcon kivete zapremnine 50 mL te se pročišćene suspenzije nanoSe koriste za daljnja istraživanja.

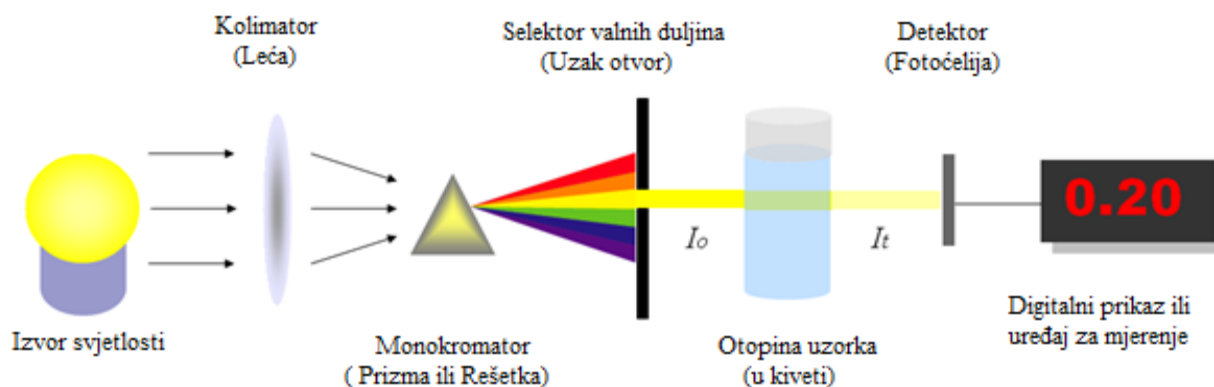
### 3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nanoSe

Analiza spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom koji mjeri apsorbciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Dio svjetla koji prolazi kroz otopinu ispitivane molekule se apsorbira od strane molekule, a dio se propušta. Spektrofotometrom se mjeri neapsorbirano zračenje odnosno intenzitet svjetla koje je prošlo kroz uzorak i uspoređuje ga se sa intenzitetom ulaznog svjetla. Instrument stoga omogućava mjerenja apsorbcije, transmitancije (izražene u %) te određivanje koncentracije analita u ispitivanim otopinama pomoću Lambert-Beerovog zakona:

$$A = \epsilon cl$$

gdje je  $A$  apsorbcija na danoj valnoj duljini,  $\epsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent izražen u  $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ ,  $c$  je molarna koncentracija otopine izražena u  $mol dm^{-3}$ , a  $l$  je duljina uzorka kroz koju prolazi svjetlost izražena u cm (<https://chem.libretexts.org/>).

UV/VIS spektrofotometar koristi svjetlost u ultraljubičastom dijelu (185-400 nm) i vidljivom dijelu (400-700 nm) spektra elektromagnetskog zračenja. Osnovni dijelovi spektrofotometra prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Osnovni dijelovi spektrofotometra (preuzeto s [www.chem.libretexts.org](http://www.chem.libretexts.org))

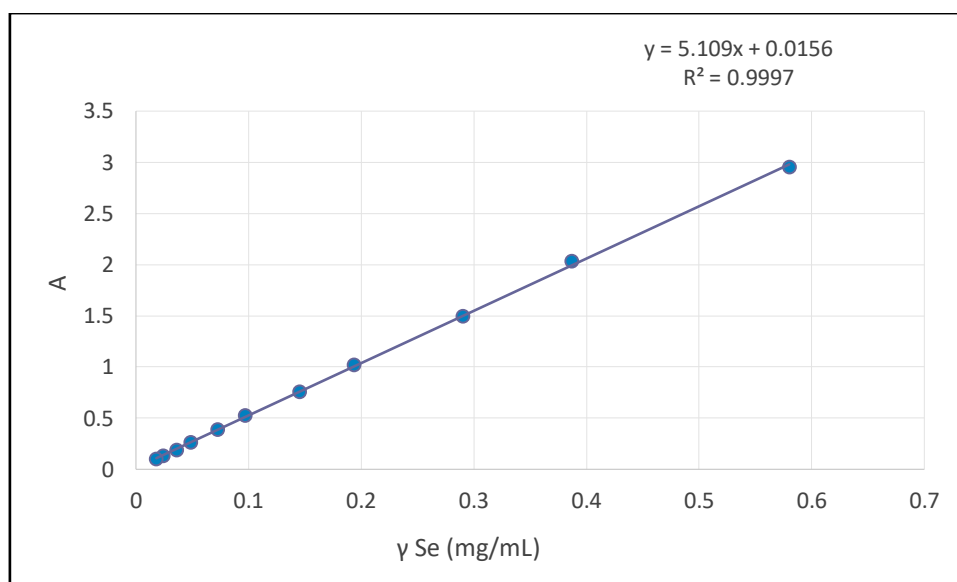
Način spektrofotometrijskog određivanja koncentracije analita u otopini svodi se na dva koraka: u prvom koraku se mjere apsorbcije otopina poznatih koncentracija te se na temelju dobivenih apsorbcija konstruira baždarni pravac, a u drugom koraku se mjere apsorbcije otopina analita nepoznate koncentracije. U prvom koraku iz podataka dobivenih mjerenjem apsorbcije otopina nanoSe devet poznatih koncentracija (Tablica 2.) konstruira se baždarni dijagram (Slika 3.) koji prikazuje ovisnost apsorbcije o koncentraciji nanoselena pri  $\lambda_{max}$  (405 nm) te se iz tih podataka odredi jednadžba pravca koji je opisan

Lambert-Beerovim zakonom. Pomoću baždarnog dijagrama na temelju izmjerene apsorpcije određene su koncentracije nanoSe u analiziranim uzorcima.

Tablica 2. Koncentracijski niz otopina Na-selenita korištenih za kemijsku sintezu nanoSe i izradu baždarnog dijagrama

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
n Se (mg/mL)*	0,580	0,388	0,290	0,194	0,145	0,097	0,073	0,484	0,036	0,024	0,018	0,000

\* Teoretske koncentracije nanoSe u mjenim otopinama izračunate na temelju koncentracije Na selenita korištenog u procesu sinteze nanoSe uz pretpostavku 100%-tnog iskorištenja reakcije



Slika 3. Baždarni dijagram ovisnosti apsorpcije o koncentraciji nanoSe pri valnoj duljini od 405 nm

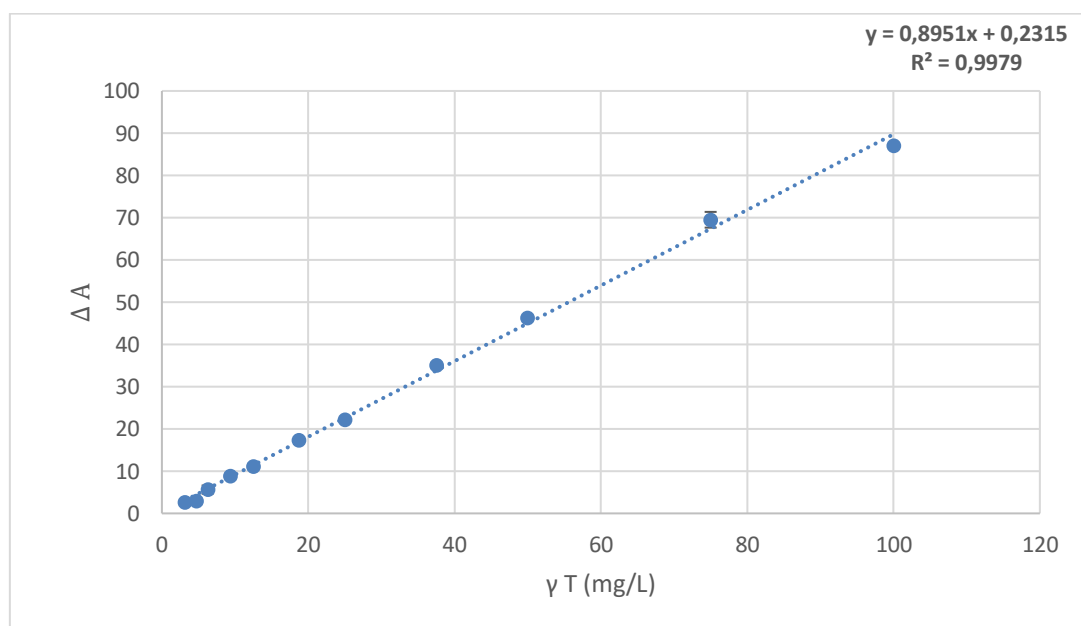
### 3.3.5. Određivanje antiradikalnog potencijala TEAC metodom

TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da neutralizira ABTS (2,2'-azino-bis (3-tilbenzotiazolin-6-sulfonat)) radikal kation što rezultira smanjenjem apsorpcije reakcijske otopine. Apsorpcijski spektar  $ABTS^+$  karakterizira glavni apsorpcijski maksimum na 415 nm te sekundarni apsorpcijski maksimumi na 660, 734 i 820 nm. Gašenje radikala u prisutnosti antioksidansa rezultira smanjenjem intenziteta obojenja reakcijske smjese i to proporcionalno

koncentraciji antioksidansa u reakcijskoj smjesi. Velika prednost ove metode za određivanje antiradikalnog potencijala je topljivost ABTS-a u vodenim i kiselo-organskim otapalima što je čini pogodnom za određivanje antiradikalne aktivnosti i hidrofилnih i lipofilnih supstrata (Vitali Čepo, 2017).

Pri mjerenju antioksidativnog potencijala najprije se izrađuje baždarna krivulja koja pokazuje ovisnost gašenja apsorbancije reakcijske smjese u ovisnosti o koncentraciji antioksidansa i to pomoću otopina Troloxa raspona koncentracija 3 - 100 mg/L. Uzorci nepoznate antioksidacijske aktivnosti se adekvatno razrijeđuju kako bi se osigurala ona koncentracija koja smanjuje apsorbanciju zbog ABTS radikala ispod 50%.

Za provođenje postupka, otopina ABTS radikala se razrijedi oko 10 puta destiliranom vodom (tako da njena apsorbancija bude  $0.700 \pm 0.02$ , mjereno pri 750 nm). Zatim se u jažice mikrotitarske ploče pipetira 20  $\mu\text{L}$  uzorka / Trolox standarda / blanka (otopina korištena za otapanje uzorka) u triplikatu. U jažicu se doda 200  $\mu\text{L}$  razrijeđenog  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  te se reakcijska smjesa mućka 60 sekundi i inkubira još 90 sekundi na temperaturi od 30 °C. Zatim se mjeri apsorbancija svakog uzorka.



Slika 4. Baždarni dijagram međuovisnosti koncentracije ABTS radikala i gašenja apsorbancije reakcijske smjese

Smanjenje inicijalne apsorbancije uzoraka izračunato je pomoću formule (1)

$$\Delta A\% = \frac{A(B) - A(\text{uzorka})}{A(B)} * 100\%$$



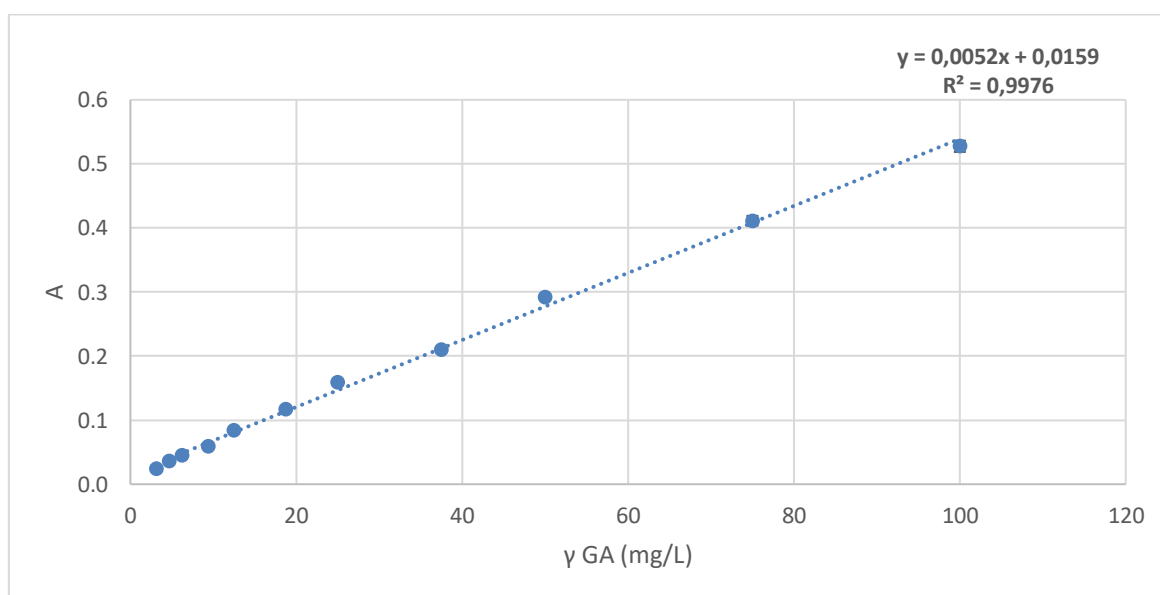
gdje je A-apsorbancija uzorka, B-apsorbancija blanka.

Korištenjem TEAC baždarnog dijagrama (Slika 4.) izračuna se antioksidacijska aktivnost uzoraka koja se izražava kao Trolox ekvivalent TE (mg/L). Te vrijednosti za svaki uzorak podijeljene su s koncentracijom Se svakog uzorka te su dobivene vrijednosti TE po jedinici mase Se.

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

Točan kemijski sastav Folin–Ciocalteu reagensa nije poznat; zna se da sadrži komplekse fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Reakcija određivanja redukcijskog potencijala temelji se na transferu elektrona u alkalnom mediju s fenolnih spojeva (i drugih tvari s redukcijskim potencijalom) na molibden, pri čemu nastaje plavi kompleks, a intenzitet nastalog obojenja mjeri se na 750 – 765 nm. Udio reducirajućih tvari u uzorku proporcionalan je intenzitetu nastalog obojenja. Kao standard za izradu baždarnog dijagrama najčešće se koristi galna kiselina pa se rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (Vitali Čepo, 2017).

Za izradu baždarnog dijagrama najprije se izradi otopina galne kiseline od koje se napravi koncentracijski niz koncentracija 3 – 100 mg/L. Baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost intenziteta obojenja reakcijske smjese o koncentraciji galne kiseline prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Baždarni dijagram međuovisnosti koncentracije galne kiseline i apsorbancije reakcijske smjese

Za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala najprije se 20  $\mu\text{L}$  svakog uzorka standarda ili otopine korištene za otapanje uzorka (blank) doda na mikroploču u triplikatu. Zatim se reakcijskoj smjesi doda 50  $\mu\text{L}$  10% (vol/vol) Folin-Ciocalteu reagensa i reakcijska smjesa se inkubira protresanjem na temperaturi 37 °C 5 minuta (60 sek protresivanja i 210 sek inkubiranja). Nakon toga se u svaku jažicu doda 160  $\mu\text{L}$  700 mM natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) te inkubira uz protresivanje mikroploče na 37 °C.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se koristi u ovoj reakciji kako bi povećao lužnatost smjese (oko pH 10). U lužnatim uvjetima fenolne komponente postaju deprotonirane formirajući fenolatne ione, koji tada reagiraju brže s Folin-Ciocalteu reagensom nego što bi reagirali u kiselim uvjetima. Na kraju mjerenja očita se apsorbancija svake jažice na 750 nm.

Pomoću baždarnog dijagrama iz očitanih apsorbancija izračunat je redukcijski potencijal analiziranih uzoraka i izražen kao ekvivalenti galne kiseline po L (mg GAE/L). Dobivene vrijednosti su korigirane na količinu Se u reakcijskoj smjesi te je redukcijski potencijal izražen kao ekvivalenti galne kiseline po mg Se ( $\mu\text{g GAE/mg Se}$ ).

### 3.3.7. Određivanje raspodjele veličine čestica nanoSe

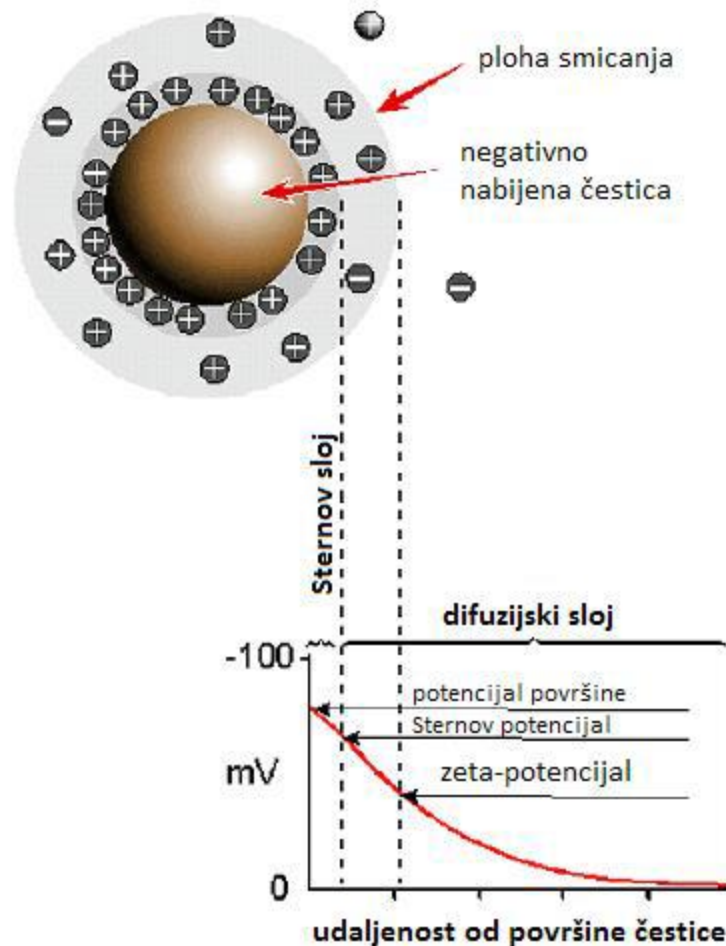
Raspodjela veličine čestica nanoSe određena je mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) koje se temelji na Brownovom gibanju raspršenih čestica. Brownovo gibanje je slučajno kretanje čestica uslijed sudara uzrokovanim molekulama otapala koje okružuju čestice (Kapur i sur., 2017). Kad se čestice rasprše u tekućini, nasumično se kreću u svim smjerovima. Princip Brownova gibanja je da se čestice neprestano sudaraju s molekulama otapala. Ti sudari uzrokuju prijenos određene količine energije koja potiče kretanje čestica. Prijenos energije je uglavnom konstantan i stoga ima veći učinak na manje čestice. Kao rezultat toga, manje se čestice kreću većom brzinom od većih čestica. Kada u suspenziji čestice budu pobuđene monokromatskim svjetlom lasera dolazi do promjene valne duljine ulaznog svjetla. Ova pojava naziva se Dopplerov efekt. Dolazi do male promjene u frekvenciji raspršenog svjetla od nerasprišenog svjetla. Upravo na temelju te promjene može se dobiti informacija o veličini, obliku i strukturi čestice (Thomas i sur., 2017).

Za mjerenje veličine čestica korišteni su nerazrijeđeni uzorci.

### 3.3.8. Određivanje zeta potencijala nanoSe

Jedno od glavnih svojstava koloidnih sustava je zeta elektrokinetički potencijal koji je zapravo naboj koji se javlja na čestici koloida. Može se objasniti kao razlika potencijala koja se javlja usred relativnog gibanja jednog sloja koloida prema drugom (Salopek i sur., 1992).

Površina čestice dispergirane faze može biti električki nabijena zbog suviška iona, što je prouzročeno adsorpcijom nekog iona iz otopine ili disocijacijom površinskih skupina. Na Slici 6. negativno je nabijena površina čestice čvrste faze. Uz negativno nabijenu površinu nalaze se pozitivno nabijeni ioni u otopini tako da ih je uz samu površinu čestice najviše, a zatim se, s udaljenošću čestice prema „dubini“ otopine, broj pozitivnih i negativnih iona izjednačava. Opisana pojava naziva se dvostrukim električnim slojem. Neposredno uz česticu se nalazi sloj pozitivnih iona koji čine tzv. Sternov sloj, kojeg je debljina reda veličine iona. Drugi dio čini Gouy-Chapmanov sloj (difuzijski dio dvostrukog sloja) ([www.malvern.com](http://www.malvern.com)).



Slika 6. Shematski prikaz zeta potencijala (preuzeto s [www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com))

Dvostruki električni sloj može se predočiti kao električni kondenzator od dviju suprotno nabijenih površina. Na Slici 6. shematizirana je i promjena potencijala u sloju ovisno

o udaljenosti od površine čestice. Potencijal na površini čestice  $\psi$ , maksimalan je, potom naglo opada (Sternov sloj), a zatim eksponencijalno (Gouy-Chapmanov sloj). Zajedno s česticama giba se i Sternov sloj te dio „vezanih molekula” otapala. Može se zamisliti da se zajedno sa česticom giba mali volumen medija odijeljen od ostalih molekula vode tzv. plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti te plohe smicanja zove se elektrokinetički ( $\zeta$ ) zeta-potencijal. Zeta potencijal je jako važan jer o njemu i naboju na površini dispergirane faze ovisi stabilnost pripremljenih disperzija (Jalšenjak i sur., 1998).

Ako sve čestice u suspenziji imaju veliki negativni ili pozitivni zeta-potencijal, onda će težiti međusobnom odbijanju i neće biti tendencije spajanja čestica. Međutim, ako čestice imaju niske vrijednosti zeta-potencijala, onda neće biti sile koja bi spriječila spajanje čestica i flokulaciju. Općenito, kao razdjelnica između stabilnih i nestabilnih suspenzija je uzeto +30 ili -30 mV (Tablica 3.). Čestice s zeta-potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV obično se smatraju stabilnima (www.malvern.com). Mjerenje zeta potencijala provedeno je na nerazrijeđenim uzorcima.

Tablica 3. Zeta potencijal i stabilnost koloida

Zeta potencijal [mV]	Stabilnost i ponašanje koloida
0 – $\pm 5$ ,	Brza koagulacija ili flokulacija
$\pm 10$ – $\pm 30$	Početna nestabilnost
$\pm 30$ – $\pm 40$	Srednja stabilnost
$\pm 40$ – $\pm 60$	Dobra stabilnost
Više od $\pm 61$	Odlična stabilnost

### 3.3.9. Statistička analiza

Sve navedene analize provedene su u triplicatu, osim mjerenja raspodjele veličine čestica koja je rađena u heksaplikatu. Statistička analiza provedena je korištenjem programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Usporedba rezultata provedena je korištenjem jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) i post hoc Turkey testa, a vrijednosti  $p \leq 0.05$  pokazuju statistički značajnu razliku između uzoraka.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje koncentracije nanoSe u analiziranim uzorcima

Koncentracije nanoselena u ispitivanim uzorcima izračunate korištenjem baždarnog dijagrama ( $y = 5.109x + 0.0156$ ) i prikazane su u Tablici 4.

Koncentracije nanoSe kretale su se od 0.413 mg/mL do 0.696 mg/mL. Najmanju koncentraciju nanoSe imao je uzorak s pročišćenim pektinima mandarine najveće koncentracije (0.18%), dok je najveću koncentraciju nanoSe, ujedno i najveće iskorištenje imao uzorak s najmanjom koncentracijom kupovnih pektina (0.01%) kao sredstvom za oblaganje.

Tablica 4. Apsorbancije (405 nm) i koncentracije nanoSe u analiziranim uzorcima

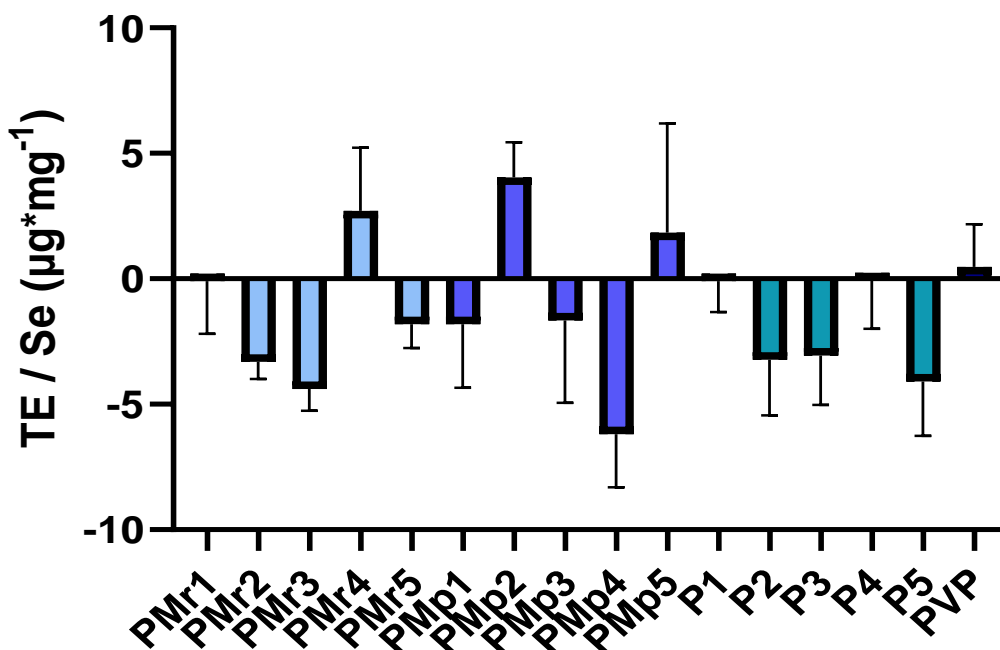
uzorci <sup>1</sup>	A (405 nm)	nSe (mg/mL)
<b>PMr3</b>	<b>0.679</b>	0.477
<b>PMr4</b>	<b>0.721</b>	0.510
<b>PMr5</b>	<b>0.681</b>	0.479
<b>PMp3</b>	<b>0.692</b>	0.487
<b>PMp4</b>	<b>0.661</b>	0.463
<b>PMp5</b>	<b>0.598</b>	0.413
<b>P3</b>	<b>0.776</b>	0.553
<b>P4</b>	<b>0.772</b>	0.550
<b>P5</b>	<b>0.639</b>	0.446
<b>PMr1</b>	<b>0.749</b>	0.532
<b>PMr2</b>	<b>0.739</b>	0.524
<b>PMp1</b>	<b>0.839</b>	0.602
<b>PMp2</b>	<b>0.682</b>	0.479
<b>P1</b>	<b>0.959</b>	0.696
<b>P2</b>	<b>0.812</b>	0.581
<b>PVP</b>	<b>0.793</b>	0.566
<b>B</b>	<b>0.054</b>	

B- blank, A – apsorbancija uzorka

<sup>1</sup> objašnjenje naziva uzoraka u Tablici 1.

## 4.2. Antiradikalni potencijal

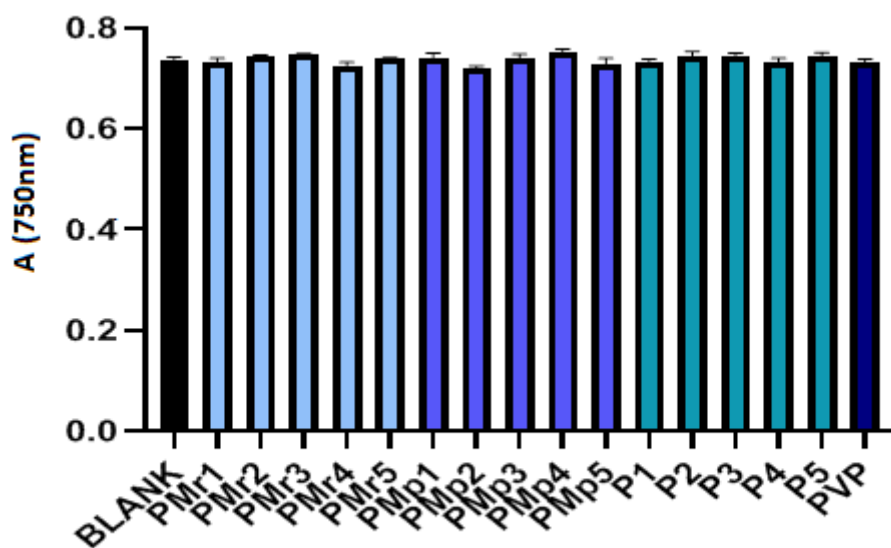
Svi analizirani uzorci pokazali su zanemarivo malene vrijednosti antiradikalnog potencijala. Grafički prikaz antiradikalnih potencijala svih uzoraka prikazan je na Slici 7. Pojedini uzorci uopće nemaju antiradikalni potencijal ili imaju blago prooksidativno djelovanje (dobivene vrijednosti su im negativne).



Slika 7. Prikaz antiradikalnih potencijala TE/Se ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) ispitivanih uzoraka<sup>2</sup>

Iz usporedbe apsorbancija uzoraka s apsorbancijom slijepe probe (Slika 8.) vidi se da nema statistički značajne razlike među dobivenim vrijednostima. Prema tim rezultatima može se zaključiti da niti jedan uzorak nema značajniji antiradikalni potencijal.

<sup>2</sup> objašnjenje naziva uzoraka u Tablici 1.

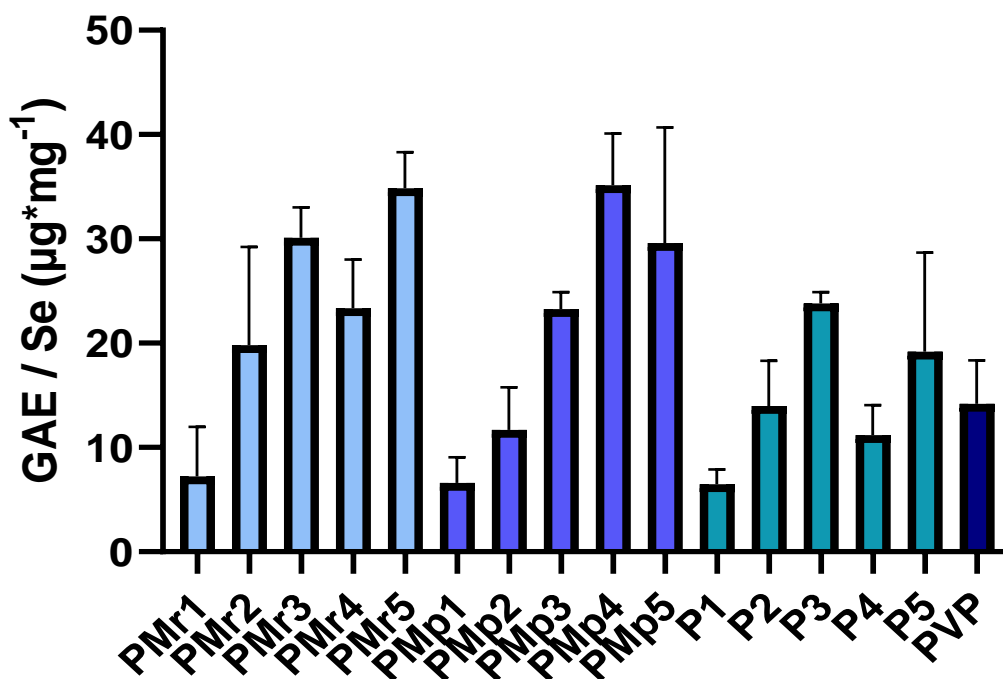


Slika 8. Apsoorbancije dobivene mjerenjem antiradikalnog potencijala reakcijskih smjesa uzoraka<sup>3</sup> nanoselena

### 4.3. Ukupni redukcijski potencijal

Ukupni redukcijski potencijali ispitivanih uzoraka (izraženi kao ekvivalenti galne kiseline) prikazani su Slikom 9. Kod uzoraka inkapsuliranih sirovim pektinima mandarine ukupni redukcijski potencijali kretali su se od 7.2 do 34.8 GAE/Se ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), dok su kod uzoraka inkapsuliranih pročišćenim pektinima mandarine bili između 6.6 i 35.1 GAE/Se ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Manje vrijednosti ukupnog redukcijskog potencijala izmjerene su kod uzoraka obloženih kupovnim pektinima (od 6.5 do 23.8 GAE/Se ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )). Kod uzorka s PVP-om kao sredstvom za oblaganje ukupni redukcijski potencijal iznosio je 14.2 GAE/Se ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Najveći ukupni redukcijski potencijal izmjeren je kod uzorka obloženog pročišćenim pektinima mandarine koncentracije 0.1% (PMP4) (35.1 GAE/Se ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )), a najmanji kod uzorka obloženog kupovnim pektinima koncentracije 0.01% (P1) (6.5 GAE/SE ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )). Prema grafu na Slici 9. može se uočiti da ukupni redukcijski potencijal uglavnom raste s porastom koncentracije pektina.

<sup>3</sup> objašnjenje naziva uzoraka u Tablici 1.

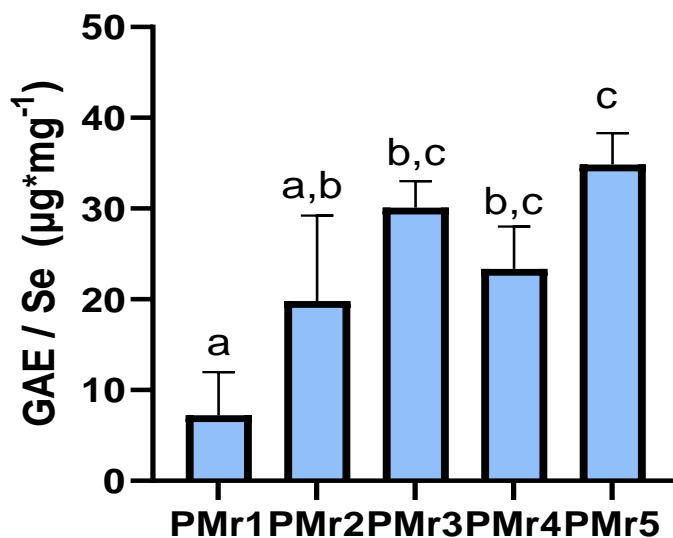


Slika 9. Prikaz ukupnih redukcijskih potencijala ispitivanih uzoraka<sup>4</sup>

Utjecaj promjene koncentracije sirovih pektina mandarine kao sredstva za oblaganje na redukcijski potencijal uzoraka nanoSe prikazan je na Slici 10. Vrijednosti redukcijskih potencijala kreću se od 7.2 do 34.8 GAE/Se (µg/mg), pri čemu najveći ukupni redukcijski potencijal ima uzorak s najvećom koncentracijom sirovih pektina (0.18%). Iz grafičkog prikaza može se uočiti porast ukupnog redukcijskog potencijala porastom koncentracije sirovih pektina u uzorcima.

<sup>4</sup> objašnjenje naziva uzoraka u Tablici 1.





Slika 10. Prikaz ukupnih redukcijskih potencijala uzoraka nanoSe uz različite koncentracije sirovih pektina kao sredstva za oblaganje

PMr1–uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%

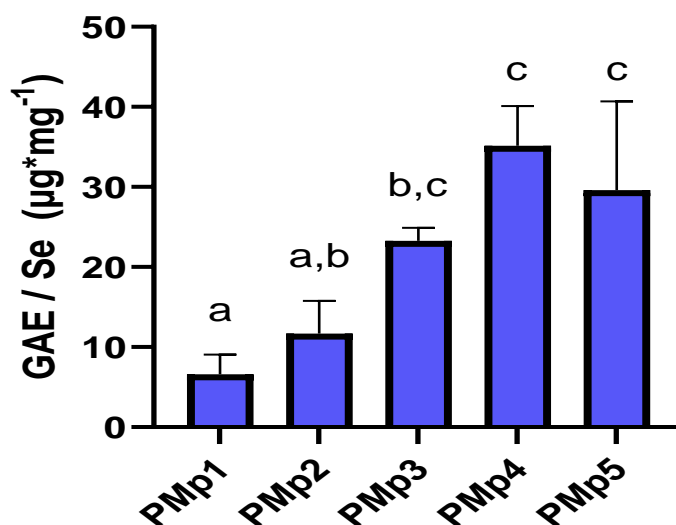
PMr2–uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%

PMr3–uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%

PMr4–uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

PMr5–uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.18%

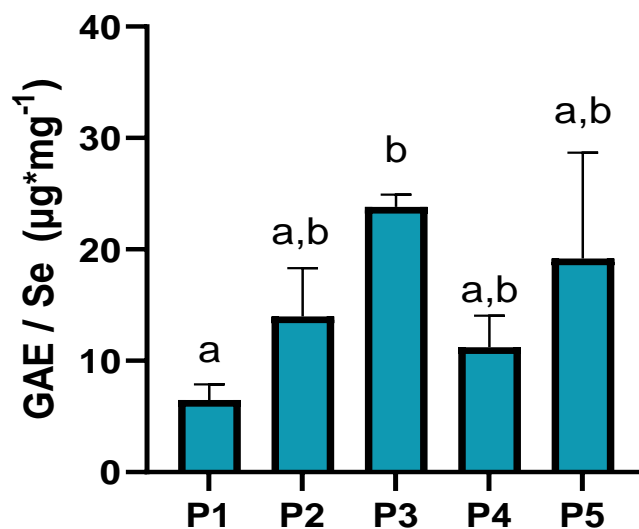
Također je provedeno istraživanje utjecaja promjene koncentracije pročišćenih pektina kao sredstva za oblaganje na redukcijski potencijal uzoraka nanoSe (Slika 11.). Može se uočiti da najmanji redukcijski potencijal ima uzorak s najmanjom koncentracijom pročišćenih pektina (6.6 GAE/Se (µg/mg)), dok najznačajniji redukcijski potencijal ima uzorak obložen pročišćenim pektinima mandarine koncentracije 0.1%, 35.1 GAE/Se (µg/mg), što je ujedno i najveći redukcijski potencijal među svim ispitivanim uzorcima. Usporedbom ukupnih redukcijskih potencijala uzoraka nanoSe uz različite koncentracije pročišćenih pektina kao sredstva za oblaganje, pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika među redukcijskim potencijalima kod prva dva uzorka (PMp1 i PMp2), zatim među uzorcima PMp2 i PMp3 te među uzorcima s najvišim koncentracijama pročišćenih pektina (PMp3, PMp4 i PMp5). I ovdje se također, kao i kod uzoraka sa sirovim pektinima, može uočiti porast redukcijskog potencijala porastom koncentracije pročišćenih pektina.



Slika 11. Prikaz ukupnih redukcijskih potencijala uzoraka nanoSe uz različite koncentracije pročišćenih pektina kao sredstva za oblaganje

PMp1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%; PMp2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%; PMp3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%; PMp4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%; PMp5-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.18%

Uspoređujući ukupne redukcijske potencijale uzoraka nanoSe uz različite koncentracije kupovnih pektina kao sredstva za oblaganje (Slika 12.) utvrđeno je da nema statistički značajne razlike redukcijskih potencijala izraženog kao GAE/Se (µg/mg) među svim uzorcima osim kod uzorka s koncentracijom kupovnih pektina od 0.05% (P3), odnosno 0.01% (P1). U ovom slučaju nije utvrđena korelacija između koncentracije kupovnog pektina i redukcijskog potencijala uzoraka.



Slika 12. Prikaz ukupnih redukcijskih potencijala uzoraka nanoSe uz različitih koncentracija kupovnih pektina kao sredstva za oblaganje

P1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%

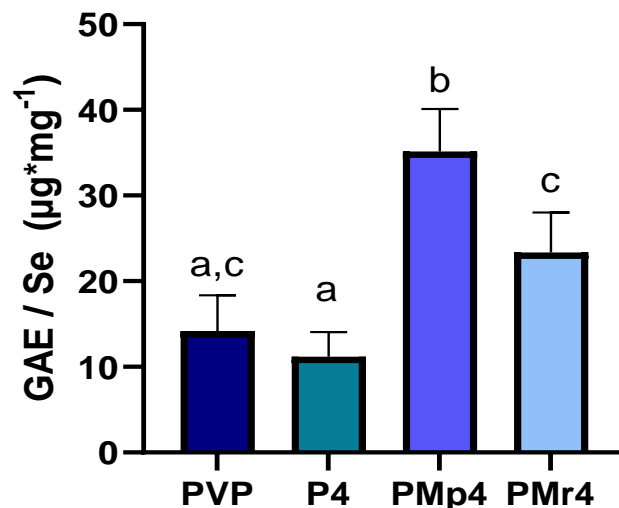
P2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%

P3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%

P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

P5-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.19%

Iz međusobne usporedbe redukcijskih potencijala uzoraka nanoSe inkapsuliranih različitim vrstama pektina te PVP-om (Slika 13.) može se zaključiti da nema statistički značajne razlike u redukcijskim potencijalima među uzorcima obloženim polivinilpirolidonom i kupovnim pektinima te među uzorcima obloženim polivinilpirolidonom i sirovim pektinima. Značajno najveći redukcijski potencijal ima uzorak obložen pročišćenim pektinima. . Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se korištenjem pročišćene pektinske frakcije dobivene iz komine mandarine mogu dobiti nanočestice selena značajno poboljšanog antioksidacijskog potencijala.



Slika 13. Prikaz redukcijskih potencijala uzoraka nanoSe uz različite vrste pektina kao sredstva za oblaganje te PVP-a

PVP-uzorak sintetiziranog nanoSe uz PVP kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1 %

P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1 %

PMr4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

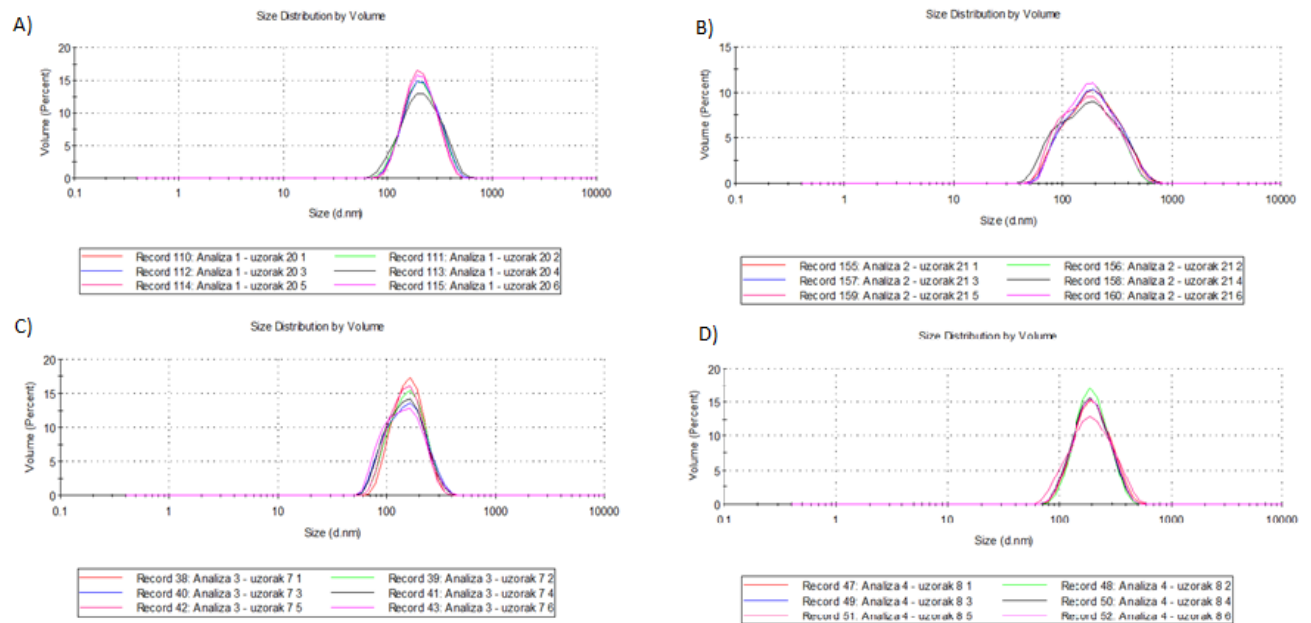
PMp4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

Prema radu Qiu i sur. (2018), koji su sintetizirali nanoSe uz kupovne pektine te ih karakterizirali TEAC metodom, najveće TEAC vrijednosti su postignute u uzorku s omjerom Se/kupovni pektin 1:2 (222.18 Trolox/g uzorka). Daljnje povećanje udjela Se (Se/kupovni pektin 4:3) dovelo je do pada TEAC vrijednosti, što se djelomično podudara s rezultatima u ovom radu.

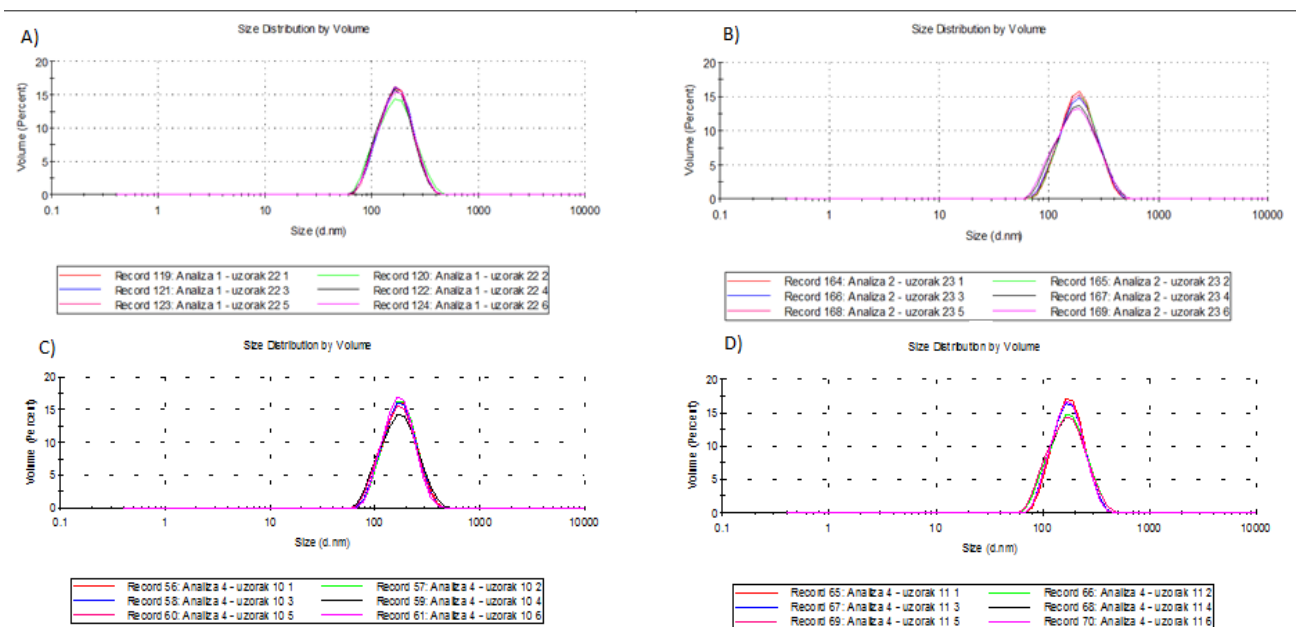
#### 4.4. Veličina nanočestica

Rezultati mjerenja veličine nanočestica DLS metodom prikazani su Slikama 14. - 17. Dobivena je unimodalna raspodjela veličina čestica te je na svakom grafičkom prikazu vidljiv jedan pik. Dobivene vrijednosti veličine čestica kretale su se od 108 nm do 221.3 nm. Prema dostupnoj literaturi, nanočestice veličine oko 100 nm pokazuju zadovoljavajuću oralnu bioraspoloživost, dok se puno veće čestice (osobito one >200 nm) vrlo slabo apsorbiraju. Nadalje, nanočestice Se bitno manje od 100 nm smatraju se toksičnijima dok nanočestice veće od 100 nm imaju veću tendenciju aglomeriranja (Kapur i sur., 2017). Stoga smo u našem radu

uzorke veličina čestica najbližih  $100 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$  smatrali optimalnima (Kapur i sur., 2017; Pan i sur., 2009).

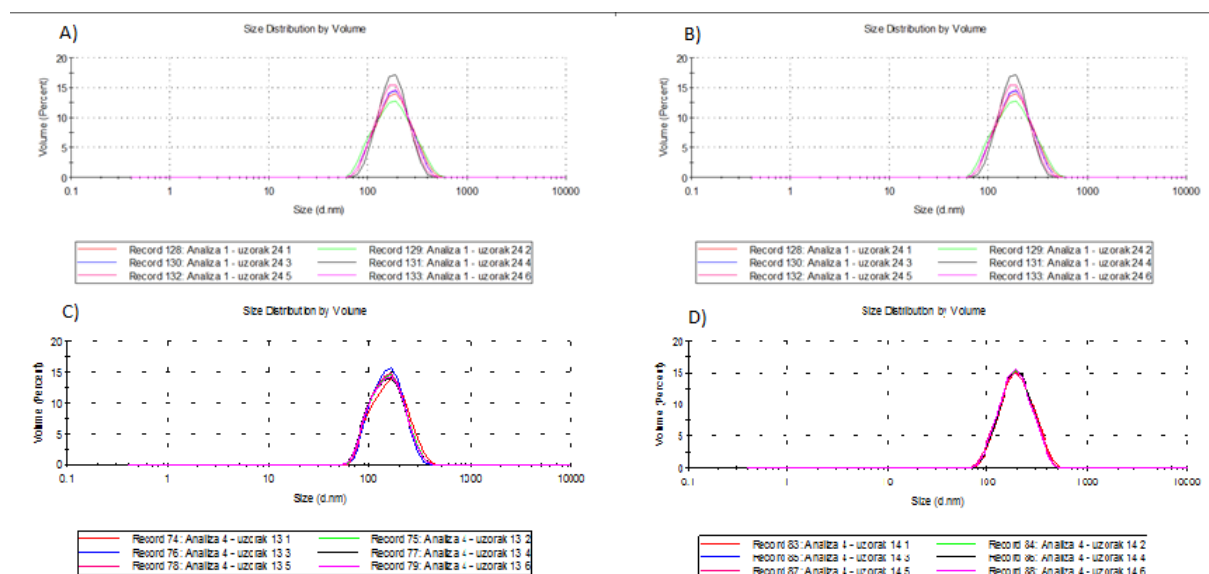


Slika 14. Raspodjela veličine čestica nanoselena po volumenu za uzorak inkapsuliran sirovim pektinima mandarine koncentracije 0.01% (A); sirovim pektinima mandarine koncentracije 0.02% (B); sirovim pektinima mandarine koncentracije 0.05% (C); sirovim pektinima mandarine koncentracije 0.1% (D)

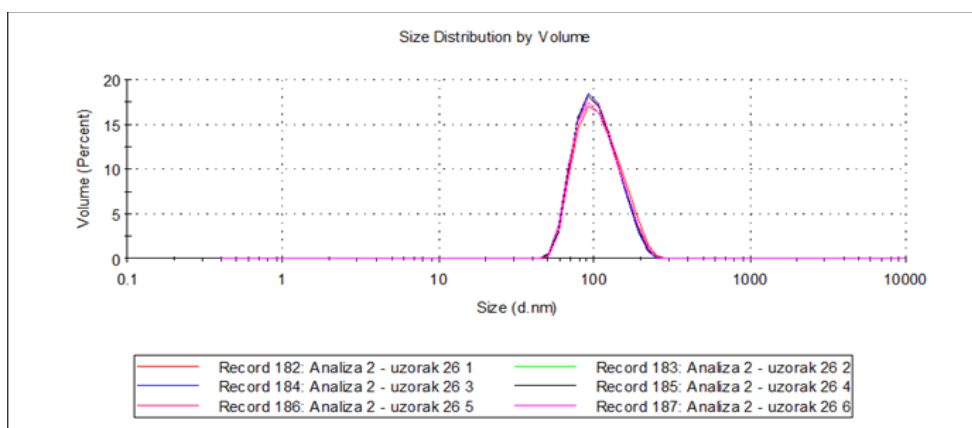


Slika 15. Raspodjela veličine čestica nanoselena po volumenu za uzorak inkapsuliran pročišćenim pektinima mandarine koncentracije 0.01% (A); pročišćenim pektinima

mandarine koncentracije 0.02% (B); pročišćenim pektinima mandarine koncentracije 0.05% (C); pročišćenim pektinima mandarine koncentracije 0.1% (D)



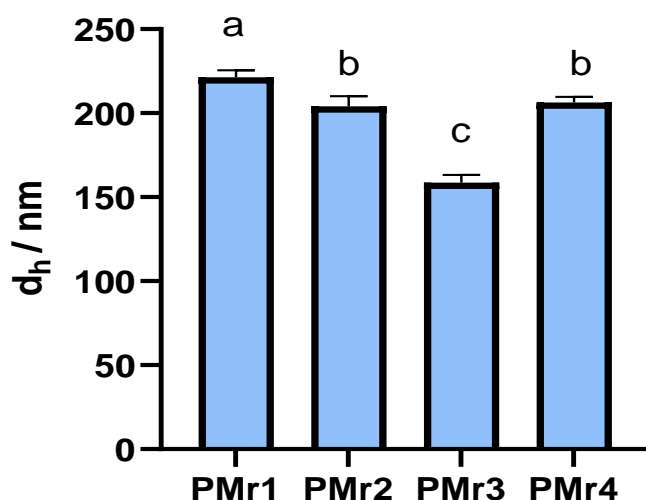
Slika 16. Raspodjela veličine čestica nanoselena po volumenu za uzorak inkapsuliran kupovnim pektinima mandarine koncentracije 0.01% (A); kupovnim pektinima mandarine koncentracije 0.02% (B); kupovnim pektinima mandarine koncentracije 0.05% (C); kupovnim pektinima mandarine koncentracije 0.1% (D)



Slika 17. Raspodjela veličine čestica nanoselena po volumenu za uzorak inkapsuliran polivinilpirolidonom koncentracije 0.1%

Promatrajući Sliku 18. može se uočiti da je najveća veličina čestica nanoSe kod uzorka obloženog sirovim pektinima mandarine koncentracije 0.01% (221.3 nm), dok najmanju veličinu čestica ima uzorak obložen sirovim pektinima mandarine koncentracije 0.05% (158.6 nm). Statistički jednake veličine čestica nanoSe imaju uzorci koncentracije

pročišćenih pektina 0.02% i 0.1%. Može se zaključiti da s povećanjem koncentracije sirovih pektina, do 0.05%, dolazi do smanjenja veličine čestica, dok kod najveće koncentracije pektina od 0.1% ponovno dolazi do povećanja veličine čestica. Pretpostavljamo bolju raspoloživost kod čestica promjera oko 100 nm, te se stoga uzorak s koncentracijom pektina 0.05% (PMr3) smatra optimalnim.



Slika 18. Prikaz veličina čestica uzoraka nanoSe inkapsuliranih sirovim pektinima različitim koncentracija

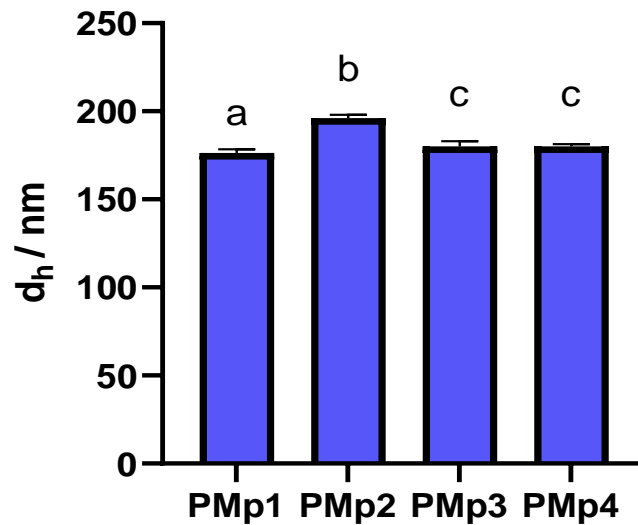
PMr1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%

PMr2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%

PMr3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%

PMr4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

Iz Slike 19. može se uočiti da su sve nanočestice dobivene inkapsulacijom sirovim pektinima mandarine podjednake veličine, nešto veće od 150 nm, bez obzira na koncentraciju pektina u reakcijskoj smjesi. Najmanje čestice nanoSe dobivene su inkapsulacijom pročišćenim pektinima mandarine koncentracije 0.01% (176.3 nm).

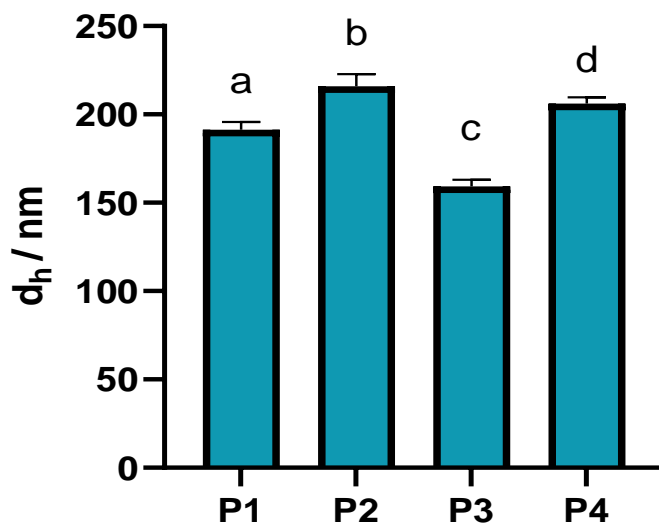


Slika 19. Prikaz veličina čestica uzoraka nanoSe inkapsuliranih pročišćenim pektinima različitih koncentracija

PMp1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%; PMp2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%; PMp3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%; PMp4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

Iz statističke analize prema grafičkom prikazu na Slici 20. vidljivo je da koncentracija kupovnog pektina u reakcijskoj smjesi bitno utječe na veličinu dobivenih nanočestica selena. Naime, svi su uzorci statistički značajno različiti te nema nikakve povezanosti između veličine čestica i koncentracije kupovnih pektina. Najveću veličinu čestica nanoSe ima uzorak obložen kupovnim pektinima koncentracije 0.02% (216.0 nm), dok najmanju veličinu čestica ima uzorak obložen kupovnim pektinima koncentracije 0.05% (159.3 nm).





Slika 20. Prikaz veličina čestica uzoraka nanoSe inkapsuliranih kupovnim pektinima različitim koncentracija

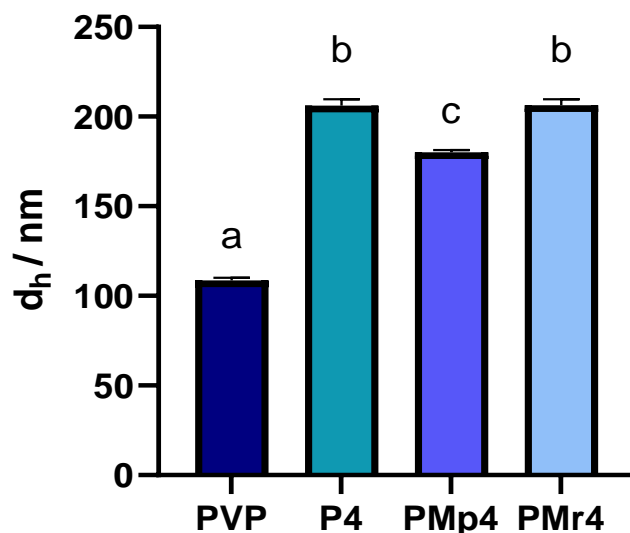
P1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%

P2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%

P3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%

P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

Zaključno, odabir inkapsulacijskog sredstva bitno utječe na veličinu nanočestica selena. Kao što je prikazano na Slici 21. podjednake veličine čestica nanoSe imaju uzorci sintetizirani uz kupovni pektin koncentracije 0.1% i sirovi pektin mandarine koncentracije 0.1%. Najmanju veličinu čestica nanoSe ima uzorak sintetiziranog nanoSe uz PVP kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1% (108.6 nm).



Slika 21. Prikaz veličina čestica uzoraka nanoSe inkapsuliranih različitim sredstvima za oblaganje

PVP-uzorak sintetiziranog nanoSe uz PVP kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

PMr4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

PMp4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

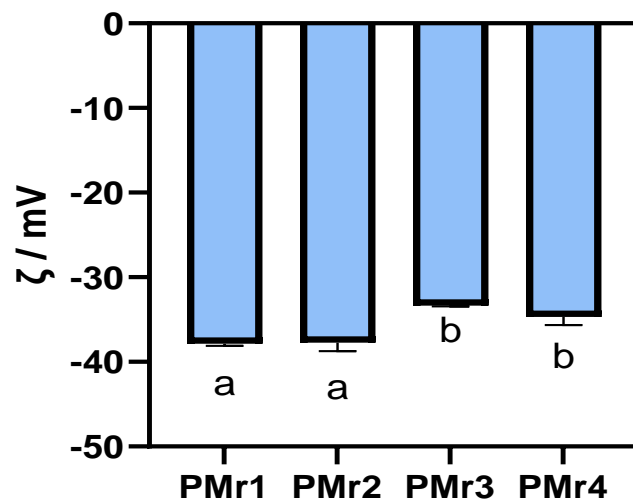
Istraživanje slično ovome proveli su Cruz i sur. (2018) koji su u svome radu sintetizirali nanoSe zelenom sintezom pomoću različitih vrsta bakterija. Najveće čestice nanoSe bile su sintetizirane u bakterijama *Staphylococcus aureus* ( $180.1 \pm 20.4$  nm), dok su najmanje čestice nanoSe bile sintetizirane kod *E.coli* ( $120.0 \pm 15.9$  nm). Veličine čestica nanoSe vrlo su slične veličinama dobivenim u ovome radu.

U svome radu, Qiu i sur. (2018) su sintetizirali nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje te ga karakterizirali DLS metodom. Dobiveni rezultati pokazivali su smanjenje veličina čestica nanoSe povećanjem omjera Se/pektin od 1:40 do omjera 1:2 (smanjenje veličine čestica od 358.3 nm do 242.5 nm), a daljnjim povećanjem veličine čestica su počele rasti (od 242.5 nm do 330.3 nm), što se djelomično podudara s ovdje dobivenim rezultatima.

#### 4.5. Zeta potencijal

Prema Slici 22. statistički jednake zeta potencijale imaju prva dva uzorka s najmanjom koncentracijom sirovih pektina (-37.8 mV i -37.7 mV) te zadnja dva uzorka (-33.4 mV i -34.7

mV). Iz dobivenih rezultata mjerenja može se uočiti da se povećanjem koncentracije sirovih pektina smanjuje negativnost zeta potencijala. Smanjenje negativnosti zeta potencijala porastom koncentracije sirovih pektina može ukazivati na smanjnje stabilnosti čestica nanoSe. Naime, zeta potencijal može biti indikator stabilnosti nanosustava. Međutim, nanosustavi se mogu stabilizirati i sterički, stoga manje negativan zeta potencijal može ukazivati na manju stabilnost sustava ali ne nužno.



Slika 22. Prikaz zeta potencijala među uzorcima čestica nanoSe inkapsuliranih sirovim pektinima različitih koncentracija

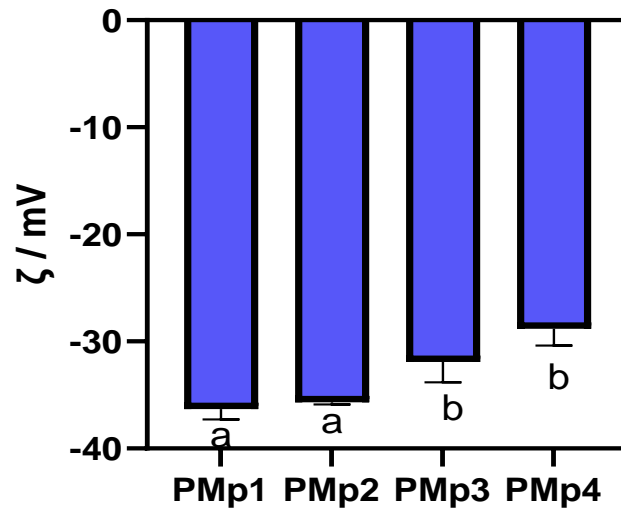
PMr1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%

PMr2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%

PMr3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%

PMr4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

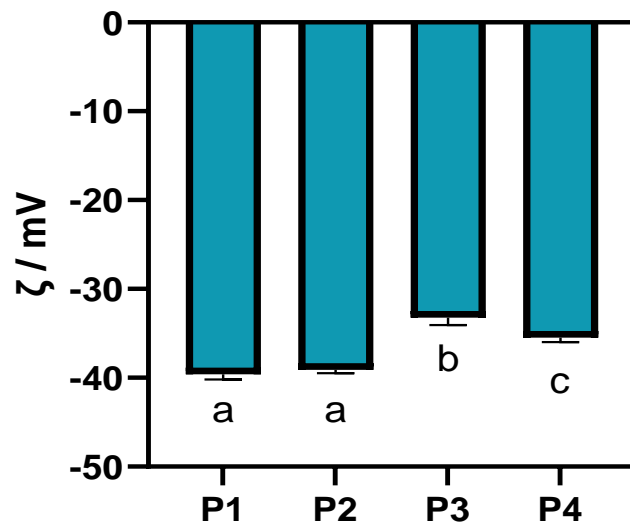
Iz prikaza na Slici 23. statistički jednako negativne zeta potencijale imaju uzorci obloženi pročišćenim pektinima koncentracije 0.01% i 0.02% (-36.3 mV i -35.7 mV), te uzorci obloženi pročišćenim pektinima koncentracije 0.05% i 0.1% (-31.9 mV i -28.8 mV), kao i kod uzoraka obloženih sirovim pektinama. Ovdje također dolazi do pada negativnosti zeta potencijala čestica nanoSe povećanjem koncentracije pročišćenih pektina, što može ukazivati na pad stabilnosti nanosustava.



Slika 23. Prikaz zeta potencijala među uzorcima čestica nanoSe inkapsuliranih pročišćenim pektinima različitih koncentracija

PMp1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%; PMp2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%; PMp3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%; PMp4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

Iz Slike 24. može se uočiti da statistički jednake, a ujedno i najnegativnije potencijale imaju uzorci obloženi kupovnim pektinima koncentracije 0.01% i 0.02% (-39.6 mV i -39.1 mV). Ovdje dolazi do pada negativnosti porastom koncentracije kupovnih pektina do 0.05% a zatim se bilježi ponovni porast negativnost kod uzorka s najvećom koncentracijom pektina (0.1%), što može biti posljedica pogreške u mjerenju.



Slika 24. Prikaz zeta potencijala među uzorcima čestica nanoSe inkapsuliranih kupovnim pektinima različitih koncentracija

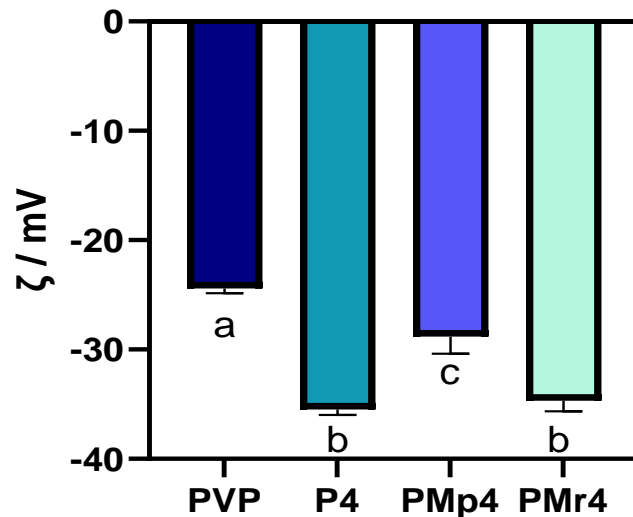
P1-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.01%

P2-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.02%

P3-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.05%

P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

S ciljem istraživanja kako različiti pektini primijenjeni u istoj koncentraciji utječu na zeta potencijal provedena je međusobna usporedba uzoraka nanoSe prikazana na Slici 25. Zeta potencijali su se kretali od -35.5 mV do -24.4 mV. Statistički jednake zeta potencijale, ujedno i najnegativnije, imali su uzorci obloženi kupovnim i sirovim pektinima koncentracije 0.1% (-35.5 mV i -34.7 mV). Zatim slijedi, prema padu negativnosti, uzorak obložen pročišćenim pektinima (-28.8 mV) te uzorak obložen PVP-om (-24.4 mV).



Slika 25. Prikaz zeta potencijala uzoraka nanoSe inkapsuliranih različitim sredstvima za oblaganje

PVP-uzorak sintetiziranog nanoSe uz PVP kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

P4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

PMr4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

PMp4-uzorak sintetiziranog nanoSe uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje koncentracije 0.1%

Istraživanje slično ovome proveli su Hileuskaya i sur. (2019) koji su u svome radu također koristili zelenu sintezu, sintetizirajući nanočestice srebra uz pektin kao sredstvo za oblaganje. Navodi se kako su zeta potencijali svih uzoraka bili negativniji od -35 mV što može ukazivati na vrlo visoku stabilnost zbog jakih odbojnih sila među nanočesticama.

Nadalje, Cremoni i sur. (2016) su provodili biološku sintezu nanočestica selena u nekoliko vrsta bakterija te su rezultati zeta potencijala pokazali da nanočestice imaju visoku elektrostatsku stabilnost sa zeta potencijalom između -70 i -80 mV što je negativnije od rezultata dobivenih u ovome radu.

Prosječni zeta potencijal nanoSe uz kupovni pektin kao sredstvo za oblaganje u radu Qiu i sur. (2018) iznosio je oko -31.6 mV što je približno jednako rezultatima u ovom radu.

Svi rezultati upućuju na to da su pektini dobro sredstvo za oblaganje te bi se mogli koristiti u daljnjim istraživanjima.

## 5. ZAKLJUČCI

- 1) Pektin komine mandarine, i sirovi i pročišćeni, može se smatrati pogodnim sredstvom za oblaganje pri sintezi nanočestica selena, jednako kao i kupovni pektin te sintetski polivinilpirolidon.
- 2) Provedenim mjerenjima nanočestice selena nisu pokazivale direktan antioksidacijski potencijal, međutim uzorci s višim koncentracijama pektina izoliranih iz komine mandarine pokazivali su određeni ukupni redukcijski potencijal, što može upućivati da su u uzorcima prisutni neki reducensi koji nemaju antioksidativni učinak; kao npr. neki šećeri, polifenoli... Pri tome su najveći ukupni redukcijski potencijal imale čestice nanoSe s pročišćenim pektinom komine mandarine koncentracije 0.05% (35.1 GAE/Se).
- 3) Primjenom sirovog pektina komine mandarine u koncentraciji 0.01 – 0.1% nastaju čestice nanoselena promjera 158.6 – 221.3 nm. Najmanje čestice nastaju kada je primjenjena koncentracija sirovog pektina 0.05%. Primjenom pročišćenog pektina komine mandarine u koncentraciji 0.01 - 0.1% nastaju čestice nanoselena promjera 176.3 – 196.1 nm. Najmanje nanočestice nastaju pri najvišoj koncentraciji pročišćenog pektina. Primjenom kupovnog pektina u koncentraciji 0.01 - 0.1% nastaju čestice nanoselena promjera 159.3 – 216.0 nm; najmanje čestice nastaju pri koncentraciji kupovnih pektina 0.05%. Kao optimalnije sredstvo za oblaganje pokazao se sirovi pektin komine mandarine u koncentraciji od 0.05%, iako prema rezultatima, postoji potreba za daljnjim istraživanjem s ciljem dobivanja još manjih nanočestica.
- 4) Primjenom sirovog pektina komine mandarine u koncentraciji 0.01 - 0.1% nastaju nanočestice selena zeta potencijala -33.4 – -37.8 mV, dok primjenom pročišćenog pektina komine mandarine nastaju čestice nanoSe zeta potencijala -28.8 – -36.3 mV. Podjednaki rezultati su dobiveni uz kupovne pektine kao sredstva za oblaganje (-33.2 – -39.6 mV). Nanočestice sa sintetskim polivinilpirolidonom imale su znatno manji zeta potencijal (-24.4 mV).
- 5) Uzevši u obzir dobivene rezultate, komina mandarine može se koristiti za izolaciju pektina koji bi služili kao sredstva za oblaganje u sintezi nanočestica metala.
- 6) Potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se dodatno usavršio protokol sinteze nanočestica selena uz pektine kao sredstva za oblaganje kako bi se dobile čestice visokog antioksidacijskog potencijala, te promjera približno 100 nm.

## 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(4), 875-877.

Banica FG. Chemical sensors and biosensors, Trondheim, Norway, A John Willey and Sons, 2012, str. 1-531.

Cremonini E, Zonaro E, Donini M, Lampis S, Boaretti M, Dusi S, Melotti P, Lleo MM, Vallini G. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. *Microb Biotechnol*, 2016, 9(6), 758-771.

Cruz DM, Mi G, Webster TJ. Synthesis and characterization of biogenic selenium nanoparticles with antimicrobial properties made by *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106A, 1400–1412.

El-Ramady HR, Domokos-Szabolcsy E, Abdalla NA, Alshaal TA, Shalaby TA, Sztrik A, Prokisch J, Fari M. Selenium and nano-selenium in agroecosystems. *Environ Chem Lett*, 2014, 12, 495–510.

Feng RW, Wei CY. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* L., a potential selenium phytoremediation plant. *Plant Soil Environ*, 2012, 58, 105-110.

Ferenčić D, Gluhić D, Dudaš S. Hranjiva vrijednost mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour). *G zaštite bilja*, 2016, 3, 46–52.

Guo X, Han D, Xi H, Rao L, Liao X, Hu X, Wu J. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydr Polym*, 2012, 88, 441-448.

Hileuskaya K, Ladutska A, Kulikouskaya V, Kraskouski A, Novik G, Kozerozhets I, Kozlovskiy A, Agabekov V. ‘Green’ approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: physicochemical characterization and antibacterial activity. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*, 2019, 585, 124-141.

Ingale AG i Chaudhari AN. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco-Friendly Approach. *J Nanomed Nanotechnol*, 2013, 4:2.



Jain R, Gonzales-Gil G, Singh V, Van Hullebusch E, Farges F, Lens PNL. Biogenic Selenium nanoparticles: Production, Characterization and Challenges. *Biotechnology Volume 10: Nanobiotechnology*. Ashok Kuma, Studium press LLC, 2014, str. 365-394.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. *Farmaceutika*. Zagreb, Školska knjiga, 1998., str. 29-30.

Kabata-Pendias A. *Trace Elements in Soils and Plants*. Boca Raton, CRC Press, 2011, str. 51-52.

Kapur M, Soni K, Kohli K. Green Synthesis of Selenium Nanoparticles from Broccoli, Characterization, Application and Toxicity. *Adv Tech Biol Med*, 2017, 5:1.

Kirupagaran R, Saritha A, Bhuvanewari S. Green Synthesis of Selenium Nanoparticles from Leaf and Stem Extract of *Leucas lavandulifolia* Sm., and Their Application. *J Nanosci NanoTechnol*, 2016, 2(5), 224-226.

Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX. In vitro anti-Helicobacter pylori action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases, *US N Library of Medicine Institutes of Health*, 2005, 98(3), 329-333.

Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Spengler U, Sauerbruch T. Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection, *Biol Trace Elem Research*, 1997, 56(1), 31-41.

Malvern Panalitical, <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction>, pristupljeno 14. 3. 2021.

Menon S, Agarwal H, Kumar SV, Rajeshkumar S. Biomimetic synthesis of selenium nanoparticles and its biomedical applications. *Micro and Nano Technologies, Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, Elsevier. Shukla AK, Iravani S, 2019, str. 165 – 197.

Nitayapat N, Prakarnsombut N, Lee JS, Boonsupthip W. Bioconversion of tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the final products. *Food Sci Technol*, 2013, 63(1), 773-779.

Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 2009, 5, 2067-2076

Pectin, <https://healthjade.net/pectin/>, pristupljeno 4. 11. 2020.

Qiu WY, Wang YY, Wang M, Yan JK. Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin-decorated selenium nanoparticles. *Colloids Surf*, 2018, 170, 692–700.

Rai MK, Deshmukh SD, Ingale AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*, 2012, 112, 841-852.

Redman C, Scott AJ, Baines AT, Basye JL, Clark LC, Calley C, Roe D, Payne CM, Nelson MA. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Lett*, 1998, 125(1-2), 103-110.

Salopek B, Krsić D i Filipović S: Measurement and application of zetapotential. *Rudarsko-geološki-naftni zbornik*, 1992, 4, 147-151.

Shaha KR, Nayagi AP, Punichelvana Y, Afandi A. Optimized Extraction Condition and Characterization of Pectin from Kaffir Lime (*Citrus Hystrix*). *Res J Agric Biol Sci*. 2013, 1, 1-11.

Sharmin S, Rahaman M, Sarkar C, Atolani O, Torequl Islam M, Stephen Adeyemi O. Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Helion*, 2021, 7.

Spectrophotometry, 2020.,

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Kinetics/02%3A\\_Reaction\\_Rates/2.01%3A\\_Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/2.1.05%3A\\_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry), pristupljeno 12. 3. 2021.

Tendo JNF, Eko NJ, Mbom YD, Tantoh ND, Rui KWM. A One Pot Green Synthesis and Characterisation of Iron Oxide-Pectin Hybrid Nanocomposite. *Open J Compos Mater*, 2013, 3, 30-37.

Thomas S, Thomas R, Zachariah AK, Mishra RK. Thermal And Rheological Measurement Techniques For Nanomaterials Characterization. *Elsevier*, 2017, 3, 37-45.

Tiwari KA, Nath Saha S, Prasad Yadav V, Kumar Upadhyay U, Katiyar D, Mishra T. Extraction and Characterization of Pectin from Orange Peels. *Int J Biotech Biochem*, 2017, 13, 39-47.

Valdes A, Burgos N, Jimenz A, Garrigos MC. Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. Coatings. Farris S, San Vicente del Raspeig (Alicante), Spain, 2015, str. 865-886.

Vitali Čepo D. Udžebenik za laboratorijske vježbe iz kolegija *Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane* za studente Studija Farmacija. Zagreb, 2017, str. 43-44.

Wang H, Zhang J, Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42, 1524-1533.

Xiao Y, Ju H, Chen H. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Anal Chim Acta*, 1999, 391, 73-82.

Yeoh S, Shi J, Langrish TAG. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 2008, 218, 229-237

## 7. SAŽETAK

Komina mandarine je otpad prehrambene industrije koji se u posljednje vrijeme sve više prepoznaje kao izvor različitih biološki vrijednih molekula. Jedan od najzastupljenijih spojeva s biološkom vrijednošću u komini mandarine jest i pektin, koji općenito ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Cilj ovog rada je bio istražiti mogućnosti primjene sirove i pročišćene pektinske frakcije komine mandarine u zelenoj sintezi nanoselena. Obje frakcije korištene su u 4 različite koncentracije, a dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima dobivenim primjenom komercijalno dostupnog pektina jabuke te polivinilpirolidona kao često korištenog sintetskog sredstva za oblaganje. Fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih nanočestica uključila je mjerenje zeta-potencijala te raspodjelu veličine čestica primjenom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Istražen je i utjecaj vrste/koncentracije sredstva za oblaganje na ukupan prinos zelene sinteze te reduktivnu i antiradikalnu aktivnost dobivenih nanočestica selena. Rezultati su pokazali da se i sirova i pročišćena pektinska frakcija komine mandarine može smatrati pogodnim sredstvom za oblaganje u zelenoj sintezi nanočestica. Ovisno o promatranom parametru, nanočestice selena dobivene inkapsulacijom pektinskom frakcijom komine mandarine usporedive su ili bolje od nanoselena dobivenog inkapsulacijom PVP-om ili komercijalno dostupnim pektinom. Potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se dodatno usavršio protokol sinteze nanočestica selena uz pektine komine mandarine kao sredstva za oblaganje kako bi se dobile čestice višeg antioksidacijskog potencijala te promjera oko 100 nm.

## SUMMARY

Mandarin pomace is a waste of the food industry that has recently been recognized as a source of various biologically valuable molecules. One of the most common compounds with biological value in mandarin pomace is pectin, which is generally widely used in the food and pharmaceutical industries. The aim of this study was to investigate the possibilities of applying the raw and purified pectin fraction of mandarin pomace in green synthesis of selenium nanoparticles. Both fractions were used in 4 different concentrations and the obtained results were compared with the results obtained using commercially available apple pectin and polyvinylpyrrolidone as a frequently used synthetic coating agent. Physico-chemical characterization of the obtained nanoparticles included measurement of zeta potential and particle size distribution using dynamic light scattering. The influence of the type/concentration of the coating agent on the total yield of green synthesis and the reductive and antiradical activity of the obtained selenium nanoparticles was also investigated. The results showed that both raw and purified pectin fraction of mandarin pomace can be considered as a suitable coating agent in green nanoparticle synthesis. Depending on the observed parameter, selenium nanoparticles obtained by encapsulation with the pectin fraction of mandarin pomace are comparable or better than selenium nanoparticles obtained by encapsulation with PVP or commercially available pectin. Further research is needed to further refine the protocol for the synthesis of selenium nanoparticles with mandarin pomace pectins as a coating agent to obtain particles with a higher antioxidant potential and a diameter of about 100 nm.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
Ul. kneza Domagoja 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Primjena pektina iz komine mandarine u zelenoj sintezi nanoselena

Nela Predović

#### SAŽETAK

Komina mandarine je otpad prehrambene industrije koji se u posljednje vrijeme sve više prepoznaje kao izvor različitih biološki vrijednih molekula. Jedan od najzastupljenijih spojeva s biološkom vrijednošću u komini mandarine jest i pektin, koji općenito ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Cilj ovog rada je bio istražiti mogućnosti primjene sirove i pročišćene pektinske frakcije komine mandarine u zelenoj sintezi nanoselena. Obje frakcije korištene su u 4 različite koncentracije, a dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima dobivenim primjenom komercijalno dostupnog pektina jabuke te polivinilpirolidona kao često korištenog sintetskog sredstva za oblaganje. Fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih nanočestica uključila je mjerenje zeta-potencijala te raspodjelu veličine čestica primjenom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Istražen je i utjecaj vrste/koncentracije sredstva za oblaganje na ukupan prinos zelene sinteze te reduktivnu i antiradikalnu aktivnost dobivenih nanočestica selena. Rezultati su pokazali da se i sirova i pročišćena pektinska frakcija komine mandarine može smatrati pogodnim sredstvom za oblaganje u zelenoj sintezi nanočestica. Ovisno o promatranom parametru, nanočestice selena dobivene inkapsulacijom pektinskom frakcijom komine mandarine usporedive su ili bolje od nanoselena dobivenog inkapsulacijom PVP-om ili komercijalno dostupnim pektinom. Potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se dodatno usavršio protokol sinteze nanočestica selena uz pektine komine mandarine kao sredstva za oblaganje kako bi se dobile čestice višeg antioksidacijskog potencijala te promjera oko 100 nm.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 25 slika, 4 tablice i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: mandarina, pektin, selen, nanočestice, zelena sinteza

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

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

**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: lipanj, 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Food Chemistry  
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Application of mandarin pectin in green synthesis of selenium nanoparticles

Nela Predović

#### SUMMARY

Mandarin pomace is a waste of the food industry that has recently been recognized as a source of various biologically valuable molecules. One of the most common compounds with biological value in mandarin pomace is pectin, which is generally widely used in the food and pharmaceutical industries. The aim of this study was to investigate the possibilities of applying the raw and purified pectin fraction of mandarin pomace in green synthesis of selenium nanoparticles. Both fractions were used in 4 different concentrations and the obtained results were compared with the results obtained using commercially available apple pectin and polyvinylpyrrolidone as a frequently used synthetic coating agent. Physico-chemical characterization of the obtained nanoparticles included measurement of zeta potential and particle size distribution using dynamic light scattering. The influence of the type/concentration of the coating agent on the total yield of green synthesis and the reductive and antiradical activity of the obtained selenium nanoparticles was also investigated. The results showed that both raw and purified pectin fraction of mandarin pomace can be considered as a suitable coating agent in green nanoparticle synthesis. Depending on the observed parameter, selenium nanoparticles obtained by encapsulation with the pectin fraction of mandarin pomace are comparable or better than selenium nanoparticles obtained by encapsulation with PVP or commercially available pectin. Further research is needed to further refine the protocol for the synthesis of selenium nanoparticles with mandarin pomace pectins as a coating agent to obtain particles with a higher antioxidant potential and a diameter of about 100 nm.

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

Thesis includes: 48 pages, 25 figures, 4 tables and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: mandarin, pectin, selenium, nanoparticles, green synthesis

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivan Pepić, 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: June 2021.