

Fitosinteza nanočestica selena korištenjem ekstrakta komine rajčice i kore mandarine

Gagro, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:336128>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



Maja Gagro

**Fitosinteza nanoselena korištenjem ekstrakta
komine rajčice i kore mandarine**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

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

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc Dubravki Vitali Čepo na iznimnom strpljenju, velikodušnoj pomoći i odličnim savjetima tijekom izrade i pisanje diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici Kristini Radić na velikoj pomoći i strpljenju u izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, kolegama s fakulteta i svim dragim ljudima koji su vjerovali u mene i bili mi velika podrška tijekom studiranja i uljepšali mi studentske dane.

Najveće hvala mojim roditeljima za bezuvjetnu i beskrajnu ljubav, brigu, podršku i vjeru u mene tijekom fakulteta i mog cijelog školovanja. Njima posvećujem ovaj diplomski rad.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. SELEN.....	1
1.1.1. Uloga selena u ljudskom organizmu.....	2
1.1.2. Metabolizam i toksičnost selena.....	3
1.2. NANOSELEN.....	5
1.2.1. Selen i nanoselen u dodatcima prehrani.....	7
1.2.2. Zelena sinteza nanočestica selena korištenjem biljnih ekstrakata (fitosinteza) i metode karakterizacije nanočestica.....	8
1.2.3. Terapijska primjena nanočestica selena.....	9
1.3. RAJČICA.....	11
1.3.1. Komina rajčice.....	12
1.4. MANDARINA.....	13
1.4.1 Komina mandarine.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Kemikalije i pribor.....	16
3.2. Instrumenti.....	16
3.3. Plan eksperimentalnog rada.....	17
3.4. Priprema suhih ekstrakata komine masline, rajčice i mandarine.....	17
3.4.1. Priprema reagensa.....	17
3.4.2. Postupak pripreme suhih ekstrakata komine rajčice i mandarine.....	17
3.5. Sinteza nanoselena.....	18
3.5.1. Priprema reagensa.....	19
3.5.2. Postupak kemijske sinteze nanočestica selena.....	19

3.5.3. Postupak fitosinteze nanočestica selena.....	19
3.6. Određivanje veličine nanočestica, zeta potencijala i sadržaja selena.....	21
3.6.1. Dinamičko raspršenje svjetlosti.....	21
3.6.2. AAS – Atomska apsorpcijska spektroskopija.....	22
3.7. Određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka.....	22
3.7.1. Folin-Ciocalteu metoda.....	22
3.7.1.1. Priprema reagensa.....	23
3.7.1.2. Postupak.....	23
3.7.2. TEAC metoda.....	24
3.7.2.1. Priprema reagensa.....	24
3.7.2.2. Postupak.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Iskorištenje postupka sinteze nanoselena.....	27
4.2. Raspodjela veličine čestica, zeta potencijal i stabilnost biogenog nanoselena.....	28
4.2.1. Raspodjela veličine čestica.....	28
4.2.2. Zeta-potencijal i stabilnost nanočestica selena.....	32
4.3. Antioksidacijski potencijal fitosintetiziranog nanoselena.....	35
4.3.1. TEAC antiradikalna učinkovitost fitosintetiziranog nanoselena.....	36
4.3.2 Reduktivna sposobnost fitosintetiziranog nanoselena.....	37
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40
7. SAŽETAK.....	45
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	47

POPIS KRATICA

- **DSL** – dinamičko raspršenje svjetlosti
- **FTIR** – Fourier transformirana infracrvena spektroskopija
- **DNA** – deoksiribonukleinska kiselina
- **OH⁻** - hidroksidni ion
- **GSH** – glutation
- **NFκB** – nuklearni faktor κB
- **HIV** – virus humane imunodeficijencije
- **RDA** – preporučena dnevna doza
- **EtOH** – etanol
- **ER** – ekstrakt kumine rajčice
- **EM** – ekstrakt kumine mandarine
- **AAS** – atomska apsorpcijska spektroskopija
- **ABTS** - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat
- **SEM** – skenirajuća elektronska mikroskopija
- **TEM** – transmisivna elektronska mikroskopija
- **XRD** – kristalografija X-zrakama
- **DPPH** - 2,2-defenil-1-pikrilhidrazil

1.UVOD

1.1.SELEN

Selen se ubraja u ubraja u elemente u tragovima i kao takav se ugrađuje u selenoproteine i nužan je za njihovo normalno funkcioniranje. Esencijalni je sastojak ljudskog organizma te je dio više vrsta enzima koji imaju jako bitnu ulogu u reprodukciji, metabolizmu hormona štitnjače, sintezi DNA i djeluje kao zaštita u oksidativnim procesima i kod infekcije (www.nih.gov). Neki od tih enzima su glutation peroksidaza, tioredoksin reduktaza, jodotironin dejodinaza, selenofosfat sintetaza, tioredoksin-glutation reduktaza (Kumar, 2014). U prirodi postoji u 2 oblika: anorganskom (selenat i selenit) i organskom (selenometionin i selenocistein) (Sunder, 2006). Oba navedena oblika mogu biti adekvatan nutritivni izvor selena. U ljudskim i životnjskim tkivima selen se većinom nalazi u obliku selenometionina, a najveća koncentracija selena u ljudskom tijelu je u skeletnom mišiću te na mišićni selen otpada oko 28-46% od ukupne količine selena u organizmu (Terry, 2012). Preporučena dnevna doza selena je 55 µg. Brazilski oraščić, morska hrana i meso najznačajniji su izvori selena u prehrani. Količina selena u određenim biljnim vrstama koje se koriste kao hrana ovisi o velikom broju čimbenika. Najbitniji čimbenik je količina selena u tlu u kojem biljka raste, zatim pH tla, količina organskih tvari u tlu te formulacija selena koja je dostupna u tlu (Rayman, 2008). Konačno, količina selena u biljkama ovisi o geografskom položaju tla u kojem biljka raste, što znači da koncentracije selena u biljkama variraju u različitim dijelovima svijeta. Selen je dostupan kao dio multivitaminskih/multimineralskih dodataka prehrani, ali se na tržištu također nalazi i kao zasebni dodatak prehrani i to u obliku selenometionina ili selenom-obogaćenih kvasaca, ali i u obliku natrijevog selenita ili natrijevog selenata. (Sunde, 2010.) On je jedan od halkogena koji nastaje kao selenat (SeO_4^{2-}), selenit (SeO_3^{2-}) i selenid (Se^{2-}) koji se mogu reducirati u atomsko stanje 0 uz pomoć adekvatnog reducensa. Nedostatak selena povezuje se s preko 40 različitih bolesti kod čovjeka, a najčešće s bolestima u čijoj je pozadini oksidacijski stres.

1.1.1 Uloga selena u ljudskom organizmu

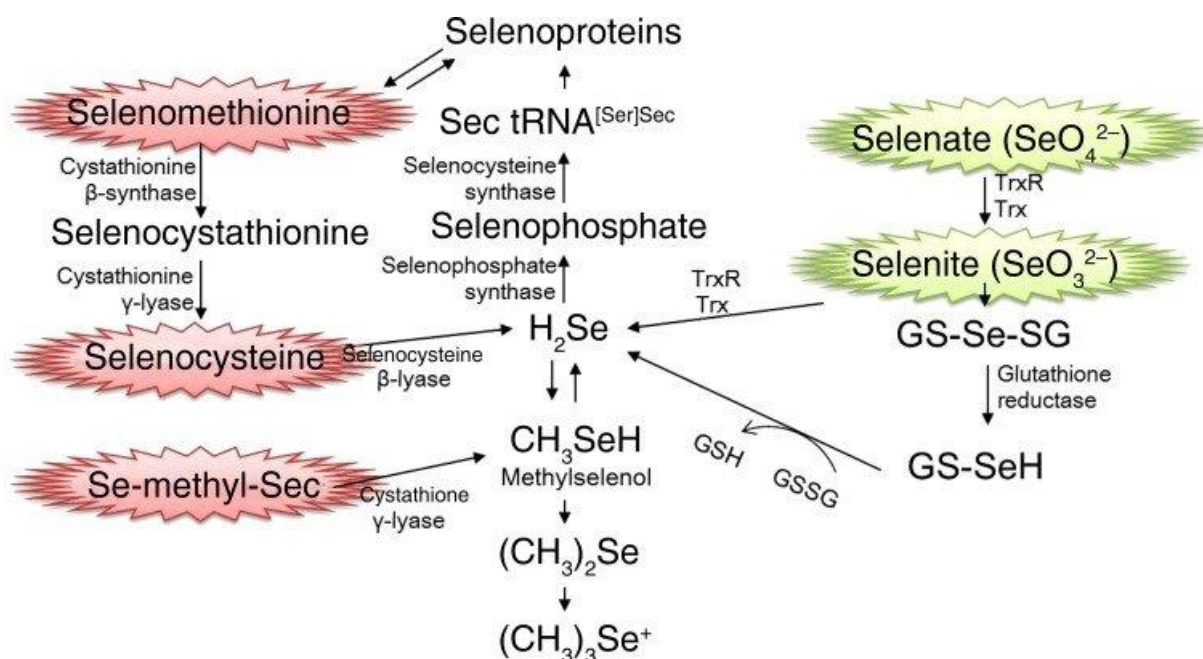
Selen sudjeluje u mnogo metaboličkih i biokemijskih procesa te kao takav ima važnu ulogu u ljudskom organizmu. Njegova se bioraspoloživost u organizmu povećava kada je prehrana bogata proteinima i vitaminima kao što su A, C i E, a smanjuje se ako prehrana sadrži povećanu koncentraciju teških metala kao što su olovo, kadmij, arsen i živa. (Navarro-Alarcon, 2008). Selen kao sastojak selenoproteina aktivira mnoge antikancerogene čimbenike, sprječava niz kardiovaskularnih i drugih bolesti te djeluje protuupalno i antiproliferativno (Renko, 2009). S deficitom selena u organizmu povezuju su različite bolesti koje u svojoj patogenezi posjeduju oksidacijski stres. Neke od njih su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, kognitivni poremećaji i bolesti štitne žlijezde (Rayman, 2019). Uloga selena u karcinomima povezuje se sa njegovim djelovanjem na popravak DNA, apoptozu, endokrini i imunološki sustav te njegovu antioksidativnu ulogu (Allen, 2008). Epidemiološke studije pokazuju mnoge poveznice između statusa selena u organizmu i rizika od karcinoma prostate, mjehura, pluća, kože te kolorektalnih i gastričnih karcinoma. Što se tiče kardiovaskularnog sustava, selenoproteini pomažu kod prevencije oksidativnih promjena na lipidima, smanjuju upalu i preveniraju agregaciju trombocita. Kod pacijenata sa neadekvatnim statusom, preporučuje se suplementacija selenom sa ciljem smanjenja rizika od pojave i smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (Bleys, 2009). Status selena (koncentracije selena u serumu) smanjuje se s godinama, a neadekvatan status u pacijenata starije životne dobi povezuje se s oštećenjima moždanih funkcija vjerojatno zbog smanjenog antioksidativnog učinka selena (Akbaraly, 2007). Koncentracija selena je osobito visoka u tkivu štitne žlijezde jer, zajedno s jodom, selen u štitnoj žlijezdi ima važnu ulogu u metabolizmu i sintezi tiroidnih hormona. (Rasmussen, 2011.) Unos selena prehranom te koncentracije selena u serumu kod ljudi razlikuju se ovisno o dijelu svijeta u kojem žive, upravo zbog razlika u količini selena u tlu i u lokalno konzumiranoj hrani. Sukladno tomu u pojedinim geografskim regijama za koje su karakteristične vrlo niske koncentracije selena u tlu, javljaju se neke specifične bolesti koje nisu direktno uzrokovane nedostatkom selena, ali je neadekvatan status selena važan (i nužan) etiološki čimbenik bolesti (Rayman, 2008.) Primjer takve bolesti je Keshanova bolest koju karakterizira endemska kardiomiopatija kod djece i mladih žena, a javlja se u kineskim pokrajinama u kojima je tlo deficitarno selenom); te Kashin-back bolest koju karakterizira stanje slično artritisu, a javlja obično kod djece u dobi od 5-13 godina u dijelovima sjeverne Kine, sjeverne Koreje i istočnog

Sibira, također tla siromašnog selenom. Duchennova mišićna distrofija je bolest povezana sa povećanom ekskrecijom selena iz organizma (Jirong, 2012).

1.1.2 Metabolizam i toksičnost selena

Bioraspoloživost selena ovisi o kemijskom obliku u kojem se nalazi, koji također utječe i na distribuciju selena u organizmu. Postoji veliki broj raznih faktora osim kemijske formulacije koji utječu na bioraspoloživost i distribuciju selena, a neke od njih status selena u tijelu, lijekovi, druge hranidbene komponente, fiziološki status i sl. (Whanger, 2002).

U normalnim fiziološkim uvjetima, selen se u skoro svim oblicima apsorbira 70-90%, a iznimka su seleniti (<60%). U najvećoj mjeri se nalazi u obliku selenometionina u kojem se pohranjuje u organe i tkiva u različitim omjerima, 30% u jetri, 30% u mišićima, 15% u bubrezima, 10% u plazmi i 15% u ostalim organima (Ducros, 2004). Homeostaza selena prvenstveno se postiže rezervama selenometionina iz bubrega i jetre, taj pohranjeni selen koristi se kada je unos hrane bogate selenom prenizak za sintezu selenoproteina (Schrauzer, 2000). Pre-intestinalna apsorpcija selena je zanemariva, dakle veći dio apsorpcije se događa u dvanaesniku i tankom crijevu. Apsorpcija selena se većinom odvija aktivnim Na-ovisnim aminokiselinskim transportnim sustavom koji se nalazi na stanicama dvanaesnika i tankog crijeva. Selenit se apsorbira jednostavnom difuzijom, dok je selenat dio kotransporta selenat/OH⁻ iona. Organski oblici (selenometionin i selenocistein) slijede mehanizme unosa aminokiselina, a selen unesen hranom apsorbira se aktivnim Na-ovisnim aminokiselinskim transportom, sličan onom kojim se apsorbira i metionin (Vendeland, 1994). Glutation (GSH) je glavna komponenta metabolizma selena. Sudjeluje u nizu reakcije redukcije. Hranom uneseni seleniti i selenati se reakcijama redukcije prevode u vodikov selenid (H₂Se). H₂Se osigurava opskrbu aktivnim selenom za sintezu selenoproteina. H₂Se prolazi niz sekvencijalnih metilacija iz kojih nastaje trimetilselenonijev ion [(CH₃)₃Se]⁺ (Gutierrez, 2001). Ukoliko se u organizmu pokaže potreba za tim, biokemijskom reakcijom iz zaliha nespecifično ugrađenih aminokiselina, procesom trans-selenacije nastaje selenocistein, koji se reducira do vodikovog selenida (H₂Se), središnjeg spoja u metabolizmu selena, istim putem kao i seleniti i selenati (Davis, 2012).



Slika 1: Prikaz metabolizma selena u organizmu (Mattmiller, 2013.)

Nakon što selen bude transformiran u biološki aktivne metabolite, on sudjeluje u kontroli razine transkripcijskog faktora NFκB, signalne transdukcije, ključnih točaka staničnog ciklusa i poboljšane apoptoze (Zamamiri-David, 2002). Izlučivanje selena putem bubrega je dominantan način izlučivanja selena iz organizma. Kako se smanjuje unos selena, smanjuje se urinarna ekskrecija metabolita selena putem bubrega, također, kako raste unos selena u tijelo, raste i urinarna ekskrecija metabolita selena putem bubrega (Schrauzer, 2000). Izlučeni metaboliti selena su većinom metilirani oblici selenida. Metabolička eliminacija komponenti selena uključuje seriju od S-adenozilmetionin-ovisnu-metilaciju otpuštajući dimetilselenid (koji se izdiše) i trimetilselen-ion (koji se ekstrahira u urinu) (Hoffman, 1987). Granice i doze selena sigurnosti i učinkovitosti su vrlo su uske te se mora biti pažljiv prilikom konzumacije selena bilo u obliku dodatka prehrani bilo u hrani bogatoj selenom (Hansen, 1996). Uzimanjem pojedinačne doze selena (250 mg) ili višestrukih doza tijekom istog dana (27-31 mg) dolazi do akutne toksičnosti zbog predoziranja (Thomson, 1998). Posljedica akutnog trovanja selenom je razaranje endokrinih funkcija, što naročito utječe na sintezu tiroidnih hormona. Kronična toksičnost selena uzrokovana je dugoročnom konzumacijom selena u obliku anorganskih i organskih komponenti. Najveća dugoročna dnevna doza selena koja se može konzumirati bez rizika od razvoja toksičnosti je u većini odrasle populacije je 800 μg. Gubitak kose i promjene na noktima na rukama su tipični znakovi selenoze ili kroničnog trovanja selenom. Ostali štetni simptomi trovanja uključuju zadah po češnjaku, sladak miris, kožni osip, metalni osjećaj u

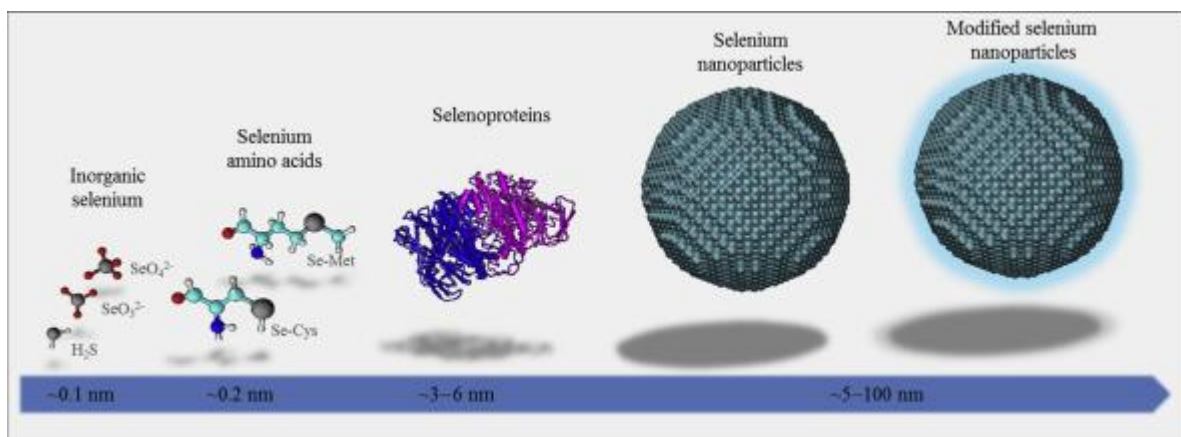
ustima, umor, probavne smetnje kao što su proljev i povraćanje, letargiju, nervozu, depresiju, gubitak tjelesne mase i gubitak zubi. Selenoza se javlja u ljudi koji su dugoročno izloženi konzumaciji selena u dozi od 5 mg selena po kilogramu mase (Koller, 1986).

1.2 NANOSELEN

Nanočestice su čestice veličine 0,1 – 1000 nm. To su tvari ili materijali koji se mogu pripremiti u laboratoriju ili se pojavljuju u prirodi, u dimenzijama koje površinu čine važnijom od mase. Veličina nanočestica je svedena na minimum, na razinu molekula ili atoma koji tvore njihovu strukturu (Vrček, 2019). Nanočestice selena privlače sve više pažnje u znanosti zahvaljujući poboljšanoj biorasploživosti, manjoj toksičnosti i većoj specifičnoj površini koju posjeduju u usporedbi sa anorganskim i organskim formulacijama selena, s tim da su organske formulacije manje toksične od anorganskih (Zheng, 2012). Biološka svojstva nanočestice selena ovise o njihovoj veličini: manje čestice imaju veću aktivnost (Torres, 2012). Selen u obliku nanočestica se na velik broj načina aplicira u biomedicini. Njegove glavne metaboličke uloge kao što su smanjenje oksidativnog stresa te smanjenje toksičnosti uzrokovane radikalima jako su dobro poznate te su neke od glavnih razloga sinteze i namjene nanočestica selena. One su se pokazale kao potencijalni način liječenja kemoterapije kao nosači za antitumorske lijekove, posjeduju antiparazitska i antimikrobna svojstva, učinkovite su u terapiji dislipidemija, imaju ulogu u imunomodulaciji i još brojne druge (Tran, 2011).

Nanočestice selena se mogu sintetizirati kemijskim putem, fizikalnim procesima ili mogu biti dobivene biološkim putem, koristeći mikroorganizme ili ekstrakte biljaka – takav način sinteze se naziva zelena sinteza (Sharma, 2014). Korištenje biljnih ekstrakata ima više prednosti u odnosu na ostale metode jer je jeftino i ne zahtijeva posebne uvjete. Različiti mikroorganizmi, dakle bakterije i gljivice posjeduju mogućnost redukcije toksičnog Se^{4+} (selenita) i /ili Se^{6+} (selenata) u manje toksični Se^0 prilikom stvaranja nanočestica selena. Sinteza nanočestica selena pomoću mikro- i makroorganizama uslijed koje dolazi do različite redukcije enzima u mikroorganizmu, uključuje dobivanje čestica različitog oblika i morfoloških svojstava. Biogene nanočestice selena prikazuju se kao perspektivan oblik tehnologije pogotovo njihovom mogućnošću aplikacije i primjene u mnogim poljima biomedicine, kod biosenzora i kod sanacije okoliša. Kemijske i fizikalne metode sinteze nanočestica selena su vrlo bliske i u nekim

segmentima se isprepliću i zahtijevaju slične laboratorijske uvjete kao što su temperatura, tlak, pH medija, slične uređaje i relativno velike količine kemikalija. Organizmi kao što su gljivice, biljke ili bakterije imaju sposobnost pretvorbe toksičnih tvari u manje toksične, što uključuje i mogućnost stvaranja metalnih precipitata ili nanočestice (Suresh, 2014). Neki od primjera biogene sinteze su proizvodnja nanočestica selena iz bakterijskog soja *Sulfurospirillum barnesii* i *Bacillus selenireducens* pri kojem navedene bakterije u anaerobnim uvjetima reduciraju otrovne selenite i selenate u elementarni Se^0 stvarajući pritom nanočestice (Oremland, 2004). Još jedan od primjera sinteze nanočestica selena je proces u kojem selenitna kiselina koja se nalazi u podlozi tretira biljnim ekstraktom paprike (*Capsicum annum*) u vodenom mediju na pri niskom pH i sobnoj temperaturi (Shen, 2007). Zahvaljujući takvim otkrićima, znanstvenici se usmjeravali takvom pristupu stvaranja nanočestica koji ujedno nije u velikoj mjeri štetan za okoliš. Biljke, odnosno biljni ekstrakti mogu se koristiti i u kemijskoj sintezi metalnih nanočestica, bilo sa ciljem smanjenja korištenja štetnih kemikalija u procesu sinteze ili za postizanje dodatnih poželjnih učinaka nanočestica. Za "zelenu sintezu" kojom se dobivaju nanočestice selena mogu se koristiti različiti biljni ekstrakti kao što su vodeni ekstrakt češnjaka (*Allium sativum*), ekstrakt čaja, polisaharidne otopine alge wakame (*Undaria pinnatifida*) i ekstrakt lista arjune (*Terminalia arjuna*) (Shen, 2007).



Slika 2: Prikaz nastajanja nanočestice selena (Skalickova, 2007)

1.2.1. Selen i nanoselen u dodacima prehrani

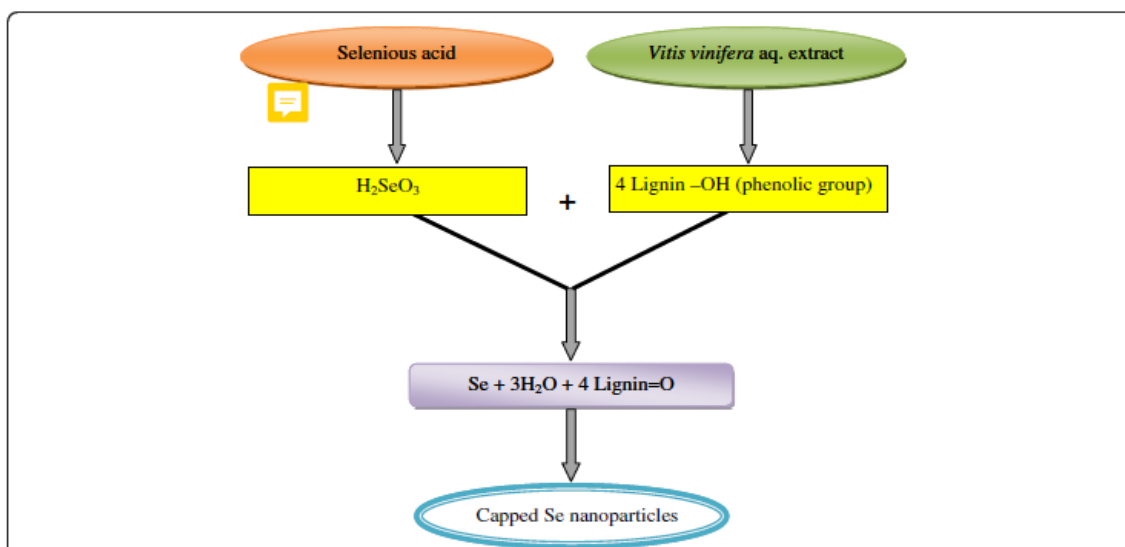
Kao što je ranije rečeno, selen se u tijelo unosi putem hrane, međutim zbog vrlo varijabilnog unosa ili u slučaju određenih bolesti kao što su HIV, kardiovaskularne bolesti, bolesti štitnjače, Chronova bolest ili teži stadiji kronične bolesti bubrega, dnevni unos selena se mora povećati. Zbog svoje uske terapijske širine i velikog potencijala toksičnosti, suplementacija selenom mora biti opravdana i dobro kontrolirana. Rutinska nadomjesna terapija preparatima selena, osobito dozama većim od RDA se stoga ne preporuča. (Spallholz, 2002.) Najčešće korišteni oblik selena u dodacima prehrani je anorganski natrijev selenit, organski selenometionin ili selen iz kvasaca bogatih selenom. Preporučena doza selena za odrasle je 55 µg dnevno, dok je u Sjedinjenim Američkim Državama 55-70 µg dnevno. U idealnom slučaju, preporučena dnevna doza selena unesena putem namirnica i dodataka prehrani bi trebala na adekvatan način održavati razinu selena u organizmu. U nekim slučajevima, sveukupna doza unesenog selena može varirati, nekad je doza prirodno unesenog selena ispod prosjeka zbog deficita selena u namirnicama, ali može biti i previsoka ako je doza selena iz namirnica povišena te može doći do čitavog niza komplikacija opasnih po život. Doziranje, a posljedično tome i učinke optimalnih doza treba podvrgnuti dovoljno čestim i kvalitetnim kontrolnim mehanizmima za sprječavanje štetnih učinaka od previsokih doza selena. Štetni učinci uzrokovani količinom unesenog selena mogu biti izbjegnuti unosom suplemenata selena koji sadrže selen u oblik nanočestica. Apsorpciju u gastrointestinalni trakt, prijenos i izlučivanje nanočestica selena u ljudskom tijelu određuju različiti parametri kao što su veličina čestica i svojstva njihove površine. Interakcija s proteinima gastrointestinalnog trakta utječe na kemijska svojstva površine nanočestica i dovodi do promjena u naboju i aglomeracijskim svojstvima, samim tim i na apsorpciju te posljedično i na učinkovitost nanočestice selena. Dakle, nanočestice mijenjaju svoja svojstva tijekom probave. Jiang i sur. (2010). su promatrali nanočestice selena u rasponu veličina od 17 – 30 nm stabilizirane pektinom, alginatom, albuminom i β-laktoglobulinom u različitom rasponu pH u gastrointestinalnom traktu. Dokazano je da je došlo do mijenjanja površine nanočestice, ali i raspodjele samih čestica u gastrointestinalnom traktu. Pri pH 2,0 koji je postignut dodatkom pepsina, nanočestice u bile manje (2-11 nm), a prije pH 7,0 čestice su bile veće (>50 nm). Iz ovog se može zaključiti da pH želučanih enzima uvelike može utjecati na svojstva nanočestice (Pornvilard, 2014). Nanočestice selena obložene kitozonom pokazale su se kao vrlo stabilne pri utjecaju različitih enzima i pri različitim rasponima pH (Zhang, 2015). Bioraspoloživost

nanočestica selena nije dobro istražena, ali postoje studije koje pokazuju da je njihova bioraspoloživost veća od anorganskog selena ili selenometionina i mogu povećati aktivnost enzima peroksidaze i tioredoksin reduktaze ovisno o svojoj veličini što je i pokazano promatranjem nanočestica selena obloženih albuminom goveđeg seruma. Za ispitivanje utjecaja veličine nanočestice na sadržaj selena u krvi i aktivnosti glutaciona S-transferaze jetre (GST), miševi su tretirani supranutritivnim dozama (Se 0,5–1,1 mg/kg) tijekom 7 dana. Rezultati su pokazali da je GST dosegla maksimalnu aktivnost ili da se približila zasićenju, a jetra je bila daleko od zasićenosti selenom (Peng, 2007). Uzimajući u obzir ova svojstva, znanstvenici su sve više zainteresirani za razvojem dodataka prehrani u kojim se selen nalazi u obliku nanočestica.

1.2.2 Zelena sinteza nanočestica selena korištenjem biljnih ekstrakata (fitosinteza) i metode karakterizacije nanočestica

Poznato je da su nanočestice selena dobivene biološkim metodama puno manje toksične nego većina nanočestica selena dobivenih kemijskim i fizikalnim putem (Zhang, 2001). Biomolekule koje se nalaze u ekstraktu biljaka mogu imati dvostruku ulogu tijekom sinteze: mogu služiti kao reducirajući agensi, ali istovremeno mogu djelovati kao sredstva za oblaganje tj stabilizatori nanosustava. U literaturi je moguće pronaći veći broj primjera uspješne primjene biljnih ekstrakata u sintezi nanoselena. Primjerice, zelena sinteza nanočestica selena uspješno je provedena redukcijom selenatne kiseline ekstraktom grožđice (*Vitis vinifera*). Kao i ostali biološki materijali, ekstrakt grožđice sadrži šećer, flavonoide i fenolne kiseline te minerale kao što su željezo, kalij i kalcij. Tijekom sinteze promjena iz bezbojne u jaku ciglasto-crvenu boju znak je stvaranja nanočestica elementarnog selena. Jedan od načina analiziranja ekstrakta *V.vinifera* je putem FTIR spektralnih studija koje ukazuju na skupine spojeva prisutne u ekstraktu grožđice (*V.Vinifera*) (Sharma et al.,2014). Na spektru su prisutna dva oštra apsorpcijska pika koja se povezuju sa OH⁻ skupinom i sa C-H vibracijom koja potječe iz organske molekule. Također primjećuje se i izraženi pik koji ukazuje na fenolnu OH skupinu. Ostale pikovi srednjeg intenziteta ukazuju na prisutnost CH₃ i OCH₃ skupina koje pripadaju

biopolimerima ekstrakta *V.vinifera* koji služe kao reducirajući agensi, a ujedno i stabilizatori nanočestica selen. Lignin koji je sveprisutan u voću, povrću i staničnom zidu sadrži fenolnu skupinu koja služi kao reducirajući agens, oksidirajući se pritom u keton tijekom redoks reakcije. Reducirajući šećeri prisutni u ekstraktu također pomažu u redukciji selenata i formiranju nanočestica elementarnog selen. Na slici 3 je prikaz jedne generalne sinteze nanočestice selen.



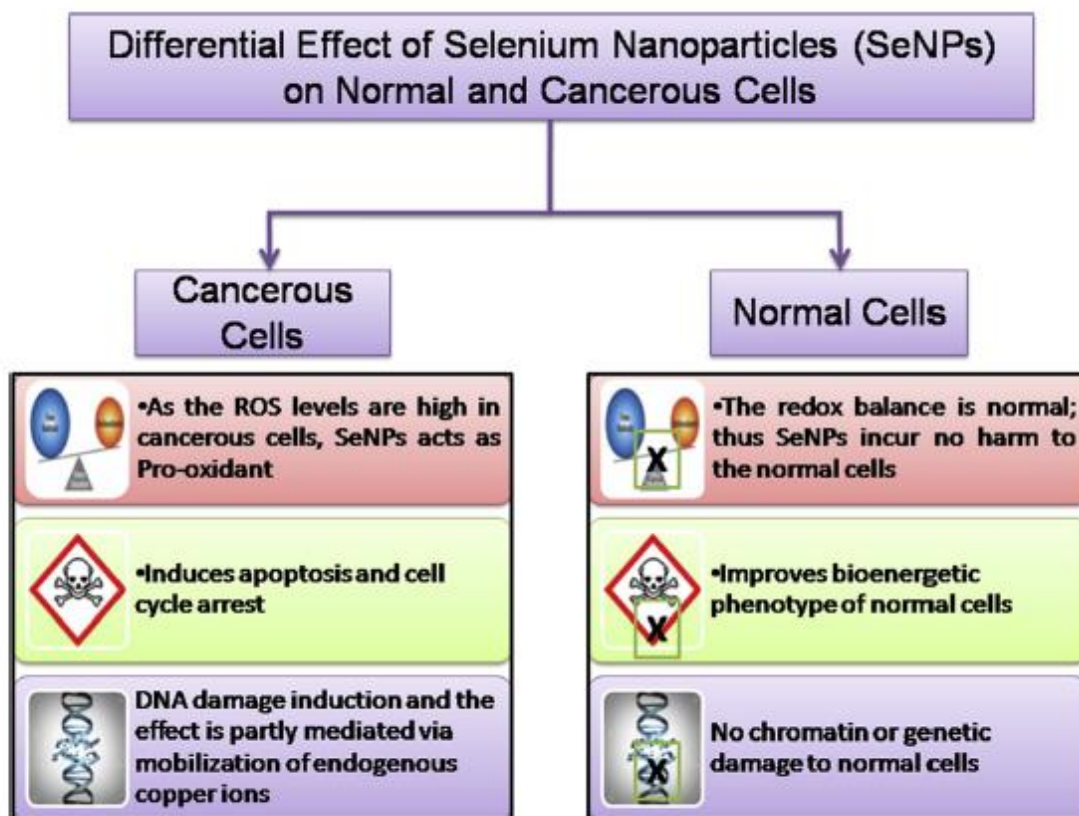
Slika 3: Sinteza nanočestice selen koristeći ekstrakt *Vitis vinifera* (Sharma et al. 2009.)

Generalno, varijacije svojstava nanočestica selen mogu proizlaziti iz načina tretiranja H_2SeO_3 različitim biljnim ekstraktima. Postoje različite tehnike pomoću kojih se mogu karakterizirati biogene nanočestice selen. Neke od njih su: Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR), atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS), difrakcija rendgenskih zraka (XRD), transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV-Vis spektroskopija), elektroforetsko raspršenje svjetlosti (ELS) i dr. Ove brojne tehnike omogućavaju nam uvid u brojna svojstva nanočestica kao što su veličina i oblik čestice, veličina pora, površina, stabilnost, kristaliničnost (Ingale i Chaudari, 2013). Upravo o opisanim karakteristikama ovisi i njihova terapijska primjena.

1.2.3 Terapijska primjena nanočestica selen

Selen ima vrlo usku terapijsku širinu i vrlo visok potencijal toksičnosti te je upravo otkriće nanočestica selen ukazalo na mogućnost korištenja selen sa smanjenim toksičnim

učinkom (Shi, 2011). Primjena nanočestica selena je istraživana u različitim stanjima oksidativnog stresa i upale u svrhu promatranja njihovog terapijskog utjecaja na različite poremećaje u organizmu. Njihova uloga u terapiji je prepoznata, ali postoji u velikoj mjeri niz nepoznanica u tome kako iste djeluju farmakokinetički i farmakodinamički na selenoproteine. Glavno svojstvo i razlog primjene nanočestica selena se temelji na njegovom antioksidativnom djelovanju koje vodi do antikancerogenih učinaka koji se pripisuju njihovom modulatornom redoks svojstvu. Nanočestice selena se zbog svog antikancerogenog djelovanja i redukcijskih svojstava smatraju boljim terapijskim izborom od ostalih oblika selena (Li, 2016). One su korištene u puno različitih primjera bolesti kao što su karcinomi, upalni poremećaji, dijabetes, fibroza jetre i toksičnost uzrokovana lijekovima. In vitro, nanočestice selena uklanjaju slobodne radikale veličine od 5-200 nm (Huang, 2015). Manje nanočestice selena veličine 5-15 nm imaju veći kapacitet uklanjanja slobodnih radikala i prevencije oksidacije DNA. Najveća mana nanočestica selena je ta što u manjoj količini ulaze u stanicu, odnosno nije istražena mogućnost ulaska većeg broja nanočestica u stanicu odjednom (Zheng, 2016). Navedeni problem se pokušava prevladati na konjugacijom određenih liganada na vanjsku površinu nanočestice, koji će služiti kao dostatan nosač u terapiji. Prooksidativni kao i antioksidativni učinci nanočestica selena predmeti su sve češćeg istraživanja nanočestica selena u terapiji. Najveći fokus korištenja nanočestica selena za različite terapijske svrhe uključuje konvencionalnu antibakterijsku, antikancerogenu, antidijabetičku i protuupalnu aktivnost. (Sun, 2014.) Što se tiče karcinoma i nanočestica selena, one pokazuju veliki potencijal za korištenje u svrhu terapije karcinoma jer smanjuju problem rezistencije na lijekove, a istovremeno ublažavaju toksičan učinak istih te omogućuju lakše prijenos lijeka na mjesto djelovanja. Osim toga, pokazuju različitu aktivnost protiv malignih i normalnih stanica što je prikazano slici 4.



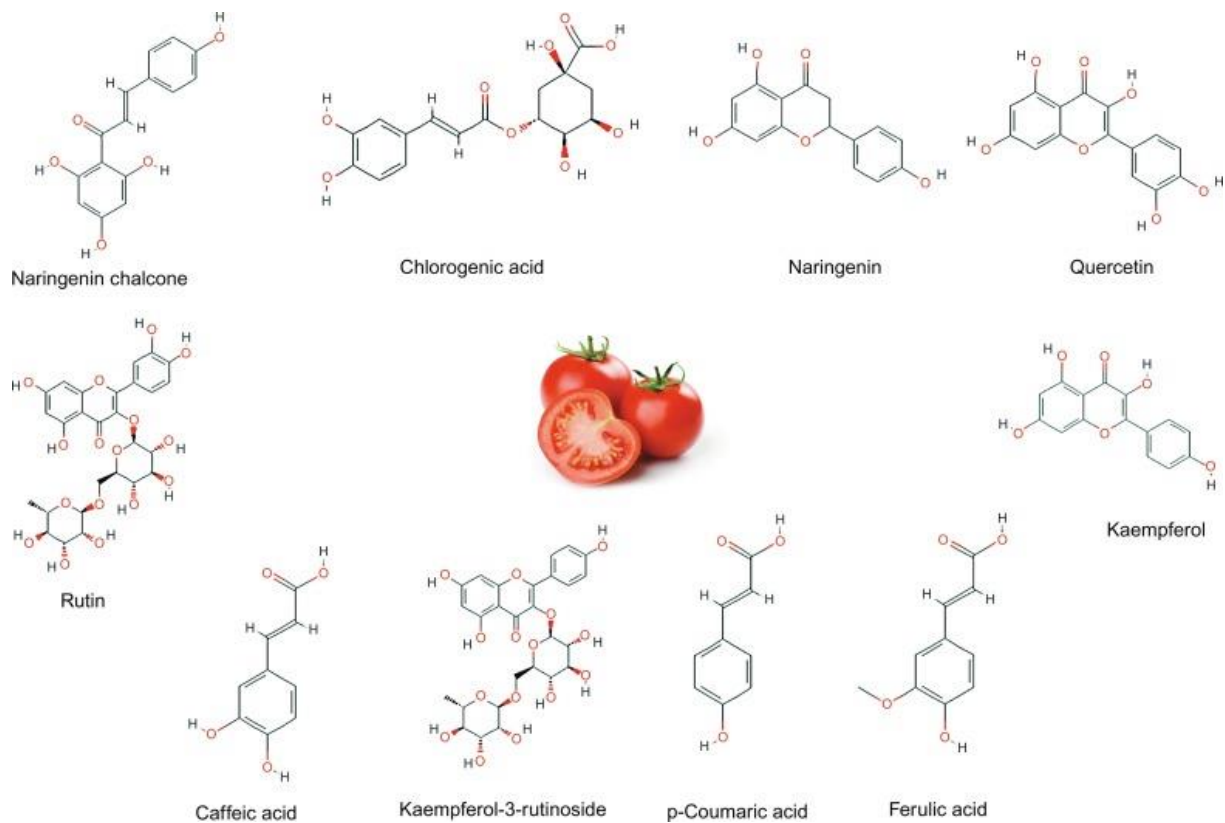
Slika 4: Usporedba utjecaja nanočestice selena na zdravu i tumorsku stanicu (A.Khurana et al., 2019.)

1.3. RAJČICA

Rajčica (*Lycopersicon esculentum* Mill.) jednogodišnja je povrtna kultura iz porodice biljaka Solanaceae. Smatra se da potječe iz područje Sjeverne ili Južne Amerike odakle je u 15.stoljeću došla na područje Europe. Danas se uzgaja gotovo u svim dijelovima svijeta i na svim geografskim širinama (Sims, 1980). Jede se plod, koji je u zrelosti crvene boje, iako može biti i žute i narančaste boje. Rajčica sadrži brojne spojeve bogate antioksidativne aktivnosti. Jedan od najjačih antioksidansa koji posjeduje je karotenoid likopen, koji je ujedno i odgovoran za jaku crvenu boju rajčice. U njenom se sastavu nalaze još neki karotenoidi kao što su lutein, fitoen, fitofluen te gama, zeta i beta karoten, oni predstavljaju jake antioksidanse koji djeluju u sinergiji sa vitaminom C i vitaminom A koje rajčica posjeduje (Foolad i Panthee, 2012).

1.3.1. Komina rajčice

Komina rajčice je mješavina kore rajčice, zdrobljenih sjemenki i male količine pulpe rajčice koja zaostaje nakon prerade rajčice u sok, ketchup ili pastu (Ventura et al., 2009). Industrijskom preradom rajčice nastaju velike količine prehrambenog otpada, čak 3-7% rajčice odlazi u otpad. Komina rajčice sadrži brojne nutritivne komponente, od kojih posebno treba istaknuti antioksidanse te se rajčicu može smatrati bogatim prirodnim resursom za izolaciju istih (Savatović i sur. 2010). Na osnovu određenih istraživanja, ustanovljeno je da komina rajčice sadrži povećanu količinu β -karotena, sterola, terpena i tokoferola, pored svih navedenih fitokemikalija potrebno je istaknuti povećane količine polifenola koji posjeduju jako antioksidativno djelovanje te ih se može iskoristiti na daljnje formulacije (Borošić, 2016).



Slika 5: Kemijski spojevi u komini rajčice (Huang, 2009.)

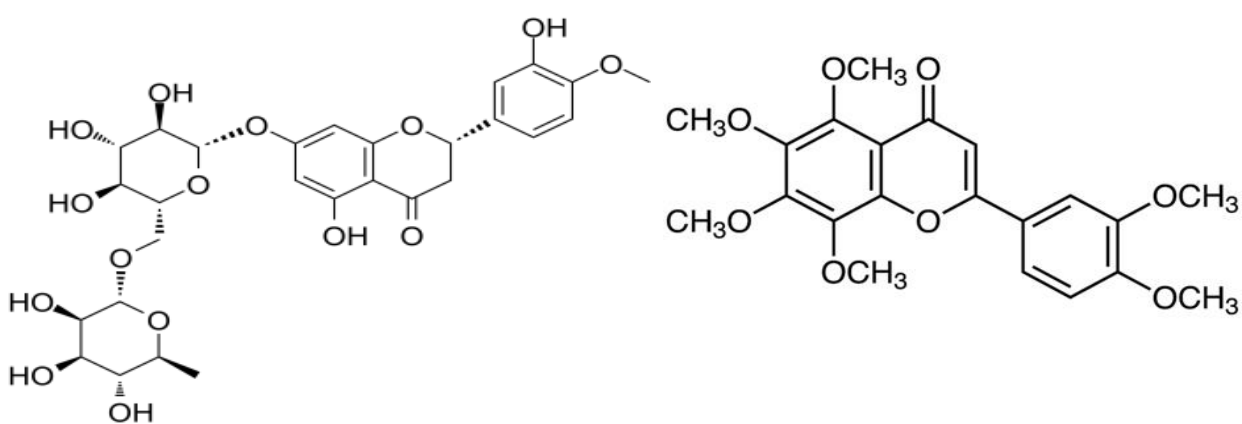
1.4. MANDARINA

Mandarina ili mandarinka (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour) je trajnozeleno drvo čije drvo može narasti od 2 do 3 metra visine. Pripada porodici rutvica (*Reticulata*), a rodu *Citrus* (Marković, 2005). Mandarina pripada grupi zimskog sezonskog voća, vrlo je cijenjena zbog svojih hranjivih, ali i antioksidativnih svojstava. Spoj kojim je posebno bogata je vitamin C ili askorbinska kiselina koji djeluje kao donator vodika te kao reducens u oksidoredukcijskim reakcijama te u brojnim biološkim procesima u organizmu. Plod je sočna boba, može biti crvene ili narančaste boje, što ovisi o sorti mandarine. Kora se sastoji od dva dijela i obojenost kore razmjerno ovisi o stupnju zrelosti ploda (Crnomarković, 2014). Karakterističan miris mandarinama daje eterično ulje koje je smješteno u uljnim žlijezdama u vanjskom dijelu kore. Njezin rast i rodnost određuju uvjeti kao što su položaj i mikroklima na kojoj raste (Popović i Vego, 2010).

1.4.1 Komina mandarine

Plod mandarine se sastoji od dva dijela: mesnatog (mezokarpa) i kore (perikarpa). Mesnati dio se sastoji od 9 – 14 krišaka u kojima se nalazi sok slatko-kiselog okusa i mirisa. Između mesnato dijela i kore se isprepliću niti zbog kojih se mandarina sistematski stavlja u porodicu rutvica (*Rutaceae*). Koru čine dva dijela : epikarp i mezokarp, koji su različite boje (Karlson, 1993). Glavni sastojak mesnatog dijela je vitamin C ili askorbinska kiselina, u 100 g mandarine nalazi se 26,7 mg askorbinske kiseline. Važno je njegovo antioksidativno djelovanje za mnoge procese u organizmu. Osim askorbinske kiseline, još jedan od važnih antioksidansa u mandarini je β -karoten iz kojeg dobivamo vitamin A. Osim navedenih antioksidansa, u mandarini postoji cijela grupa spojeva antioksidativnih svojstava, oni se nazivaju flavonoidi. Ima ih šezdestak i najviše ih se nalazi u bijelom dijelu kore (albedo). Posebno treba istaknuti

nobiletin, koji je zbog svojih jakih antioksidativnih svojstava posebno istaknut kao tvar koja snižava nakupljanje masti u jetri, sprječava kardiovaskularne bolesti i djeluje na upalne procese. (Huff, 2011.) Osim *nobiletina*, vrlo zastupljen flavonoid je *hesperidin*, čija se najveća učinkovitost pokazala u liječenje bolesti proširenih vena i hemeroida (Gami, 2011). Još je bitno spomenuti *salvestrol Q40*, koji pripada fitoaleksinima i pokazao se učinkovit u uništavanja stanica raka in vitro.



Slika 6: Kemijski spojevi koji se nalaze u komini mandarine hesperidin i nobiletin (Jašić, 2009.)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Obzirom na činjenicu da se deficit seleno u određenim populacijama javlja relativno često, a etiološki je čimbenik niza oboljenja, suplementacija selenom sve se češće preporučuje u ljekarničkoj praksi. U dodacima prehrani selen je uglavnom dostupan u obliku anorganskog selenita, organskog selenometionina te kvasaca bogatih selenom. Elementarni selen u obliku nanočestica potencijalan je novi oblik seleno koji bi se mogao koristiti u suplementaciji / obogaćivanju hrane zbog manje toksičnosti (u odnosu na anorganski selen) i dodatnih, antikancerogenih i antimikrobnih učinaka.

Korištenjem sredstava za oblaganje u sintezi nanoselena moguće je bitno mijenjati svojstva nastalih nanočestica. Cilj ovog eksperimentalnog rada jest istražiti mogućnost korištenja ekstrakata kumine mandarine i rajčice bogatih polifenolima u fitosintezi nanočestica seleno sa ciljem postizanja adsorpcije bioaktivnih komponenti iz navedenih ekstrakata na površinu nastalih nanočestica što može dovesti do pozitivnih promjena svojstava nastalih nanočestica kao što su veličina, stabilnost i antioksidacijska svojstva.

Razvoj održivih i zelenih procesa formulacije inovativnih nutriceutika također predstavlja dodatan korak u mogućnostima iskorištavanja prehrambenog otpada što rezultira nastankom proizvoda s dodanom vrijednošću te smanjenjem negativnih učinaka na okoliš.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i pribor

- Etanol (Kemig, Hrvatska)
- Na_2SeO_3 (Sigma Aldrich, SAD)
- L-askorbinska kiselina (Kemika, Hrvatska)
- Polivinilpirolidon (Sigma Aldrich, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- Bezvodni Na_2CO_3 (Lach-Ner, Češka)
- ABTS (Sigma Aldrich, SAD)
- Kalijev persulfat (Kemika, Hrvatska)
- Ultračista voda (miliQ H_2O)
- Tikvice s okruglim dnom
- Mikropipete
- Multikanalna pipeta
- Falcon kivete
- Buchnerov lijevak
- Eppendorf kivete

3.2 Instrumenti

- Analitička vaga Metler Toledo AB265S
- Vodena kupelj (GFL 1086, Helago, Češka)
- Rotavapor (Buchi, Švicarska)
- Liofilizator (Christ Alpha 1-4 LOC-1, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)

- Vortex miješalica (Multimode Plate Reader Victor™ X3 Perkin Elmer®, Velika Britanija)
- Centrifuga (Centric 322A, Tehnica, Hrvatska)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VictorX3, (Perkin Elmer, SAD)
- Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)

3.3. Plan eksperimentalnog rada

- Izrada ekstrakata komine mandarine i rajčice
- Sinteza nanoselena (kemijska i biogena)
- Određivanje prinosa sinteze nanoselena
- Analiza zeta-potencijala i raspodjele veličine čestica
- Određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka

3.4. Priprema suhih ekstrakata komine masline, rajčice i mandarine

3.4.1. Priprema reagensa

- Etanol (60%) : 312,5 ml 96% etanola se razrijedi vodom do 500 ml

3.4.2. Postupak pripreme suhih ekstrakata komine rajčice i mandarine

U ovom istraživanju se koristio suhi ekstrakt komine mandarine i rajčice na način da se odvaže cca 10 g komine (rajčice ili mandarine) i doda 200 ml EtOH. Smjesu treba inkubirati uz snažno protresanje (80-100 rpm) 2 sata na 70°C. Dobiveni ekstrakti se filtriraju kroz gusti filter

papir, a etanol se upari na rotavaporu (ukupni ekstrakt se dijeli u 4 tikvice za rotavapor (4x50 ml). Dobiveni se ekstrakti liofiliziraju. Suhi ostaci se sjedine i koriste za biogenu sintezu Se.



Slika 7: Prikaz sinteze nanočestica selena (Fotografija: Maja Gagro)

3.5 . Sinteza nanoselena

Sinteza nanoselena se temelji na redukciji natrijevog selenita Na_2SeO_3 u elementarni selen uz L-askorbinsku kiselinu koja služi kao reducens. Prilikom sinteze dolazi do stvaranja elementarnog selena koji je karakteristične crvene boje (Slika 7). Kemijska sinteza se odvija uz L-askorbinsku kiselinu koja služi kao reducens i polivinilpirolidon koji služi kao sredstvo za oblaganje. U fitosintezi korišteni su dodatno ekstrakti komine rajčice i mandarine kao prirodni izvori reducensa i/ili sredstava za oblaganje.

3.5.1. Priprema reagensa

- PVP (1%): izvagati 200 mg PVP-a i otopiti u 20 mL miliQ vode
- L-askorbinska (0.1 M) : izvagati 1.762 g L-askorbinske i otopiti u 100 mL vode
- Na_2SeO_3 (0.1 M) : izvagati 172,9 mg Na_2SeO_3 i otopiti u 10 mL vode
- Ekstrakt komine rajčice (10%): izvagati 1800 mg ekstrakta komine rajčice i otopiti u 18 mL vode (izvagano 655.5 mg)

3.5.2. Postupak kemijske sinteze nanočestica selena

U reakcijsku posudu se doda 10 ml L-askorbinske kiseline, 9 ml PVP-a i 9 ml mili-Q vode. Reakcijska se smjesa postavi na magnetsku mješalicu, u nju se ubaci mješać i brzina se podesi na 3. U reakcijsku se smjesu kap po kap, ukupno dodaje 1 ml otopine Na_2SeO_3 . Tijekom ovog dodavanja reakcijska smjesa mijenja boju u crvenu. Nakon dodatka otopine selenita, smjesa ostaje na magnetskoj mješalici još 20 minuta. Kada je reakcija gotova, reakcijska se smjesa prebacuje u kivete na centrifugiranje (50 ml) i centrifugira se 20 minuta na 4100 g. Supernatant se odlije, a u nanočestice se doda 15 ml miliQ vode. Uzorak se vorteksira i ponovno centrifugira pod istim uvjetima. Nakon centrifuge supernatant se dekantira i talog se redispergira u 5 ml miliQ vode. Suspenzija se alikvotira u Eppendorf tikvice. (za određivanje ukupnog Se, DSL karakterizaciju i određivanje antioksidacijskog potencijala)

3.5.3. Postupak fitosinteze nanočestica selena

U reakcijsku posudu se dodaju Na_2SeO_3 , L-askorbinska kiselina, sredstvo za oblaganje (PVP), ekstrakt rajčice/mandarine i voda u određenim volumenima prikazanim u Tablici 1.

	Uzorak (oznaka)	Na ₂ SeO ₃ (0.1M)	L-ask (0.1M)	ER/EC (10%)	PVP (1%)	voda
1	nSe1	1	10	-	9	9
2	BnSeR1A	1	10	1	9	8
3	BnSeR1B	1	10	1	9	8
4	BnSeR2A	1	10	2	9	7
5	BnSeR2B	1	10	2	9	7
6	BnSeR3A	1	10	3	9	6
7	BnSeR3B	1	10	3	9	6
8	BnSeC1A	1	10	1	9	9
9	BnSeC1B	1	10	1	9	9
10	BnSeC2A	1	10	2	9	8
11	BnSeC2B	1	10	2	9	8
12	BnSeC3A	1	10	3	9	7
13	BnSeC3B	1	10	3	9	7

Tablica 1: Izrada reakcijskih smjesa

Reakcijska se smjesa postavi na magnetsku mješalicu, u nju se ubaci mješač i brzina se podese na 3. U reakcijsku se smjesu kap po kap, ukupno 1 ml dodaje otopina Na₂SeO₃. Već tijekom dodavanja otopina mijenja boju u crvenu. Nakon dodatka selenita otopina se miješa na magnetskoj mješalici još 20 min. Kada je reakcija gotova (nakon 20 min), reakcijska smjesa prebacuje se u kivete za centrifugiranje i centrifugira 20 min na 4100 g. Supernatant se odlije, a u istaložene nanočestice doda se 15 mL miliQ vode. Uzorak se vorteksira i ponovno

centrifugira pod istim uvjetima. Nakon centrifuge supernatant se dekantira i talog se redispergira u 5 mL miliQ vode. Suspenzija se alikvotira u Eppendorf tikvice (za određivanje ukupnog Se, DLS karakterizaciju i određivanje antioksidacijskog potencijala)

3.6. Određivanje veličine nanočestica, zeta potencijala i sadržaja selena

3.6.1. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti koje se još naziva i foton korelacijska spektroskopija jedna je od najčešće korištenih metoda za kvantitativno određivanje veličine čestica. Temelji se na raspršenju i apsorpciji elektromagnetskog zračenja. Osnovni princip mjerenja se temelji na osvjetljenju uzorka laserskom zrakom i mjerenjem fluktuacije raspršenog svjetla pomoću fotonskog detektora. Kada svjetlost padne na čestice, intenzitet i smjer snopa se mijenjaju nakon procesa raspršenja na česticama i na taj način nam daju određene informacije o svom kretanju. Analizom fluktuacije raspršenog svjetla dobivamo vrijednost koeficijenta difuzije D , koji je u korelaciji s radijusom, čestice, R , preko Stokes-Einsteinove jednadžbe:

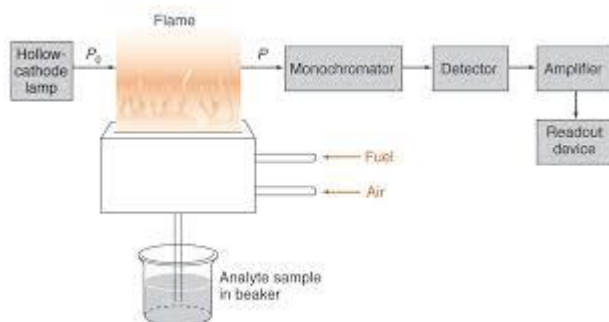
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Pri čemu je k_B Boltzmannova konstanta [$N \cdot m \cdot K^{-1}$], T temperatura [K], a η viskoznost. (Kalie, 2006.) Veličina nanočestica selena se određuje mjerenjem pomoću navede metode uz korištenje „zelenog“ lasera ($\lambda = 532 \text{ nm}$) pri temperaturi od 25°C . Dobivene funkcije analiziraju se algoritmima u programskom paketu Zetasizer (Malvern Instruments, Velika Britanija). Svaki uzorak se razrijeđivao 8 ili 10 puta. Također je provedena metoda mjerenja zeta potencijala. Elektrostatski potencijal čestica ili molekula u određenom medija naziva se zeta potencijal. On nastaje iz površinskog naboja, koncentracije i vrste iona u otopini. Mjerenjem zeta potencijala omogućava se praćenje stabilnosti otopine, koja se manifestira većom otpornošću na agregaciju čestica u otopini i bit će tim veća što je veći naboj na površini čestica otopine. (www.malvern.com) Objašnjenje pojava vezanih uz površinski naboj koji se javlja na dodiru između čvrste i tekuće faze temelji se na teoriji dvostrukog električnog sloja. Ukoliko se mjerljivi uzorak stavi pod utjecaj vanjskog električnog polja koje djeluje paralelno s

elektrokinetičkim potencijalom, pojaviti će se relativno kretanje jedne faze prema drugoj. Potencijal dobivene klizne ravnine se može izmjeriti i naziva se elektrokinetički ili zeta potencijal. Korištenjem raličitih elektrolita mijenjaju se uvjeti u otopini kao što su pH, ionska koncentracija i vrsta iona, samim tim se regulira stabilnost i mijenja zeta-potencijal.

3.6.2. AAS – Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija je vrsta spektroskopske metode kod koje određuje koncentracija elementa u ispitivanoj tvari mjerenjem intenziteta apsorpcije zračenja kod određene valne duljine koja je karakteristična za ispitivani element. Količina apsorbiranog svjetla proporcionalna je količini uzorka. To je najšire primjenjivana metoda za kvantitativno određivanje metala u tragovima i čak nekih nemetala u različitim izvorima tvari. Izvor svjetlosti u ovoj metodi je lampa čija je katoda načinjena upravo od onog elementa kojeg mjerimo, odnosno sumnjamo da se upravo on nalazi u uzorku. Atomi u plamenu apsorbiraju zračenje iz izvora. Dobiveni signal iz detektora se prenosi na računalo tako da analizirani spektar vidimo na monitoru. (Corbel, 2004.)



Slika 8: Shematski prikaz AAS (Corbel, 2004.)

3.7. Određivanje antioksidacijskog potencijala uzorka

3.7.1. Folin-Ciocalteu metoda

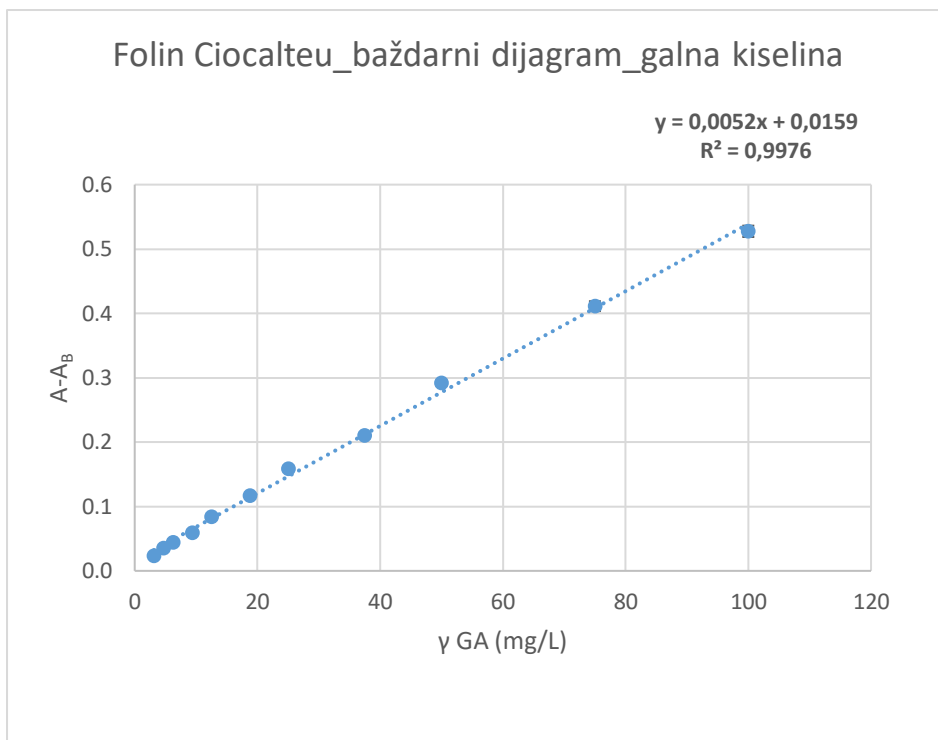
Sadržaj ukupnih fenola (ukupni reduktivni potencijal) se određuje pomoću Folin-Ciocalteu metode koja se temelji na korištenju Folin-Ciocalteu-ovog reagensa. Metoda se temelji na prijenosu elektrona iz fenolnih spojeva u alkalnom mediju na fosfomolibdenske komplekse odnosno komplekse fosfovolframove kiseline u navedenom reagensu žute boje. Nakon prijelaza elektrona s fenolnog spoja na navedene komplekse nastaju plavo obojeni kompleksi šesterovalentnog molibdena i šesterovalentnog volframa nepoznate strukture. Porast apsorbanције proporcionalan je količini polifenola odnosno svih spojeva sa reduktivnom aktivnošću i prati se spektrofotometrijski na 750 nm.

3.7.1.1. Priprema reagensa

- Na_2CO_3 (3 %) : 3,015 g Na_2CO_3 se otopi u 50 mL vode
- Folin-Ciocalteu reagens (10%) : 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa razrijedi se sa 4500 μL vode

3.7.1.2. Postupak

U jažice mikrotitarske ploče pipetira se 20 μL adekvatno razrijeđenog uzorka ili vode kao slijepe probe te 50 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Ploča se stavi u čitač mikrotitarskih ploča na miješanje u trajanju od 60 sekundi te inkubaciju na 37° C u trajanju od 210 sekundi. Potom se multikanalnom pipetom doda 160 μL 3% Na_2CO_3 , postavi se uređaj da miješa ploču 60 s te očita apsorbanciju na 750 nm nakon inkubacije od 1710 sekundi. Uz pomoć baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline odredi se redukcijski potencijal, a rezultati se izraze kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po litri. (mg GAE/L)



Slika 9: Baždarni dijagram dobiven razrijeđenjem galne kiseline

3.7.2. TEAC metoda

Za određivanje ABTS^{•+} antiradikalne učinkovitosti korištena je TEAC metoda, prema postupku Re i suradnika (1999), koja se temelji na mjerenju smanjenja apsorbancije prethodno pripremljene otopine ABTS^{•+}radikala u prisutnosti spoja s antiradikalnim učinkom. ABTS^{•+}radikal nastaje reakcijom između ABTS-a i kalijevog persulfata te je plavo-zelene boje. Obezbojenje ABTS^{•+}radikala, u prisustvu antioksidansa, može se izmjeriti na 734 nm. Kao standard se obično koristi Trolox (vodotopljiv oblik vitamina E) po čemu je metoda i dobila ime TEAC (Troloxu ekvivalentan antioksidativni kapacitet).

3.7.2.1. Priprema reagensa

- ABTS (7 mM) : 10 mg se otopi u 2,778 mL vode

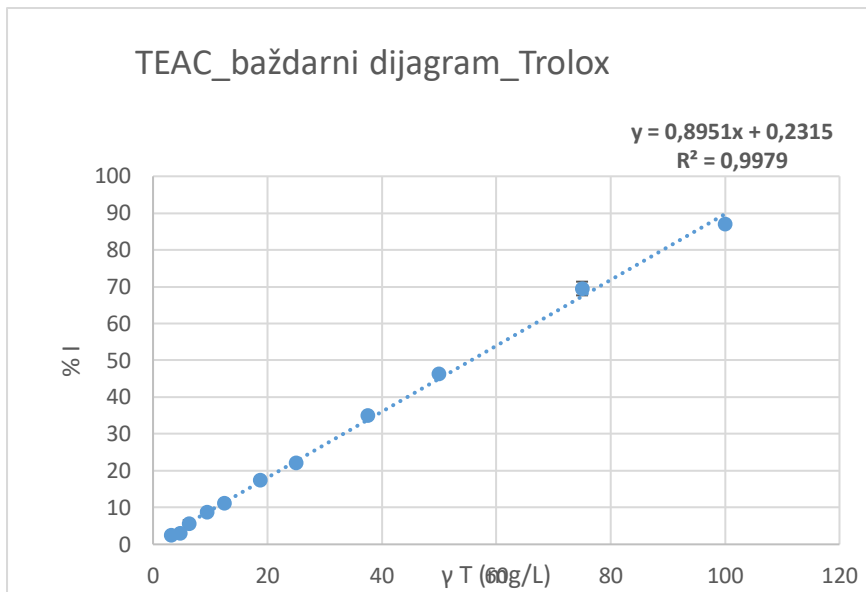
- Kalijev persulfat (2,45 mM) : 4,41 mg kalijeva persulfata se otopi u vodi te nadopuni do 10 mL
- Otopina ABTS^{•+} radikala : pomiješaju se jednaki dijelovi otopine ABTS-a i otopine kalijeva persulfata te se ista ostavi 12-16 h u mraku na sobnoj temperaturi

3.7.2.2. Postupak

Mjerna otopina pripremi se pipetiranjem 200 µL razrijeđene otopine ABTS^{•+} radikala te 20µL adekvatno razrijeđenog uzorka ili vode koje se koristi kao slijepa proba. Otopina ABTS^{•+} radikala se razrijedi 20 puta kako bi se dobila apsorbancija od 0.7 ± 0.02 AU. Uzorak se stavi u čitač mikrotitarskih pločica te se postavi da miješa ploču 60 sekundi te očita apsorbanciju na 750 nm nakon inkubacije od 90 sekundi na 30°C. Postotak inhibicije izračuna se iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije prema jednadžbi [1] .

$$[I]\% = \frac{A_{\text{slijepa proba}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{slijepa proba}}} \times 100 \quad [1]$$

Pomoću baždarnog dijagrama ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji standardnog antioksidansa Troloxa izračuna se antioksidacijski potencijal koji se izražava kao mg ekvivalenata Troloxa po litri. (mg TE/L)

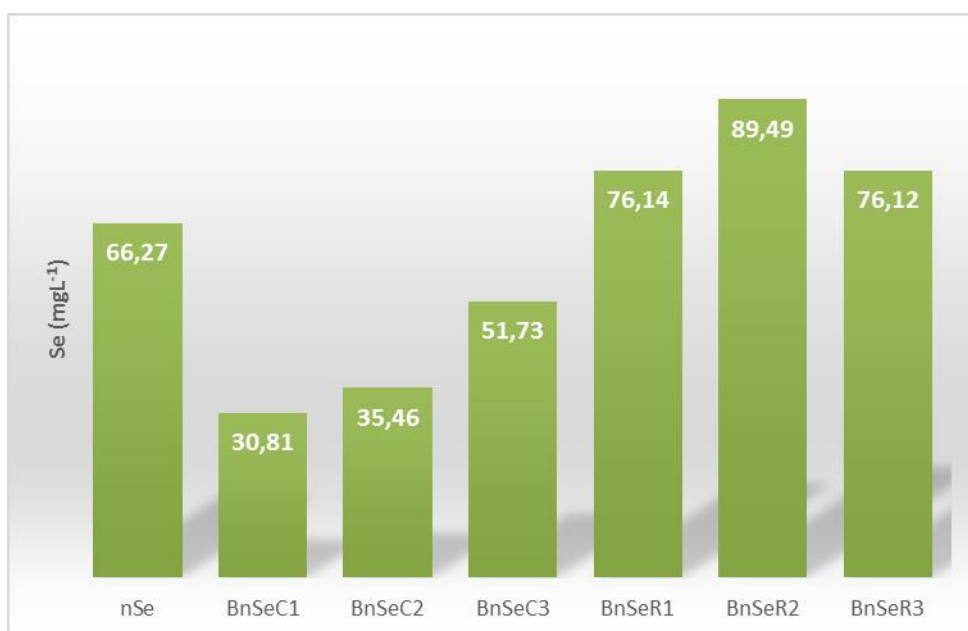


Slika 10: Baždarni dijagram dobiven razrijeđenjem Troloxa

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Iskorištenje postupka sinteze nanoselena

Količina elementarnog selena nastalog različitim postupcima sinteze određena je postupkom atomsko-apsorpcijske spektroskopije, a rezultati su prikazani na Slici 11.



Slika 11. Količine nanoselena nastale različitim postupcima sinteze

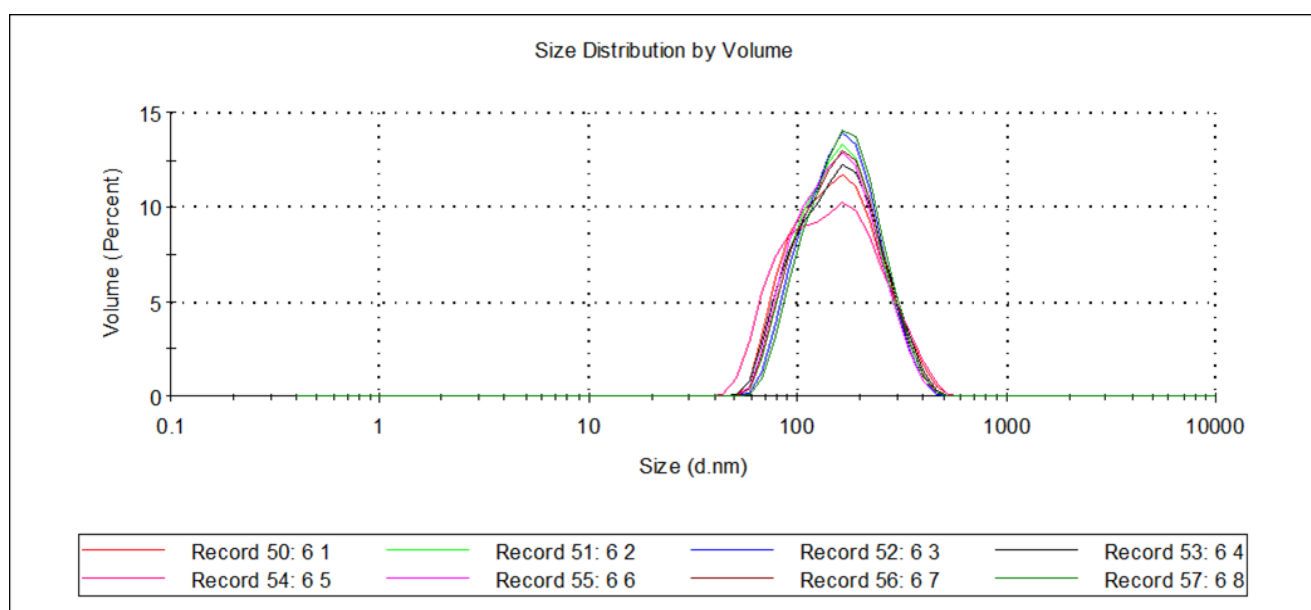
BnSeC1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kore mandarine; BnSeC2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kore mandarine; BnSeC3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kore mandarine; BnSeR1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta komine rajčice; BnSeR2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta komine rajčice; BnSeR3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta komine rajčice

Rezultati određivanja koncentracije nanoselena ukazuju na činjenicu da tijekom fitosinteze korištenjem ekstrakta komine rajčice iz iste količine selenita nastaju veće količine elementarnog nanoselena, dakle poboljšava se iskorištenje postupka u odnosu na kemijsku sintezu ili fitosintezu uz ekstrakt kore mandarine. Razlog tome je činjenica da se dodatkom biljnih ekstrakata u reakcijsku smjesu povećava redukcijska sposobnost što rezultira učinkovitijom redukcijom selenita.

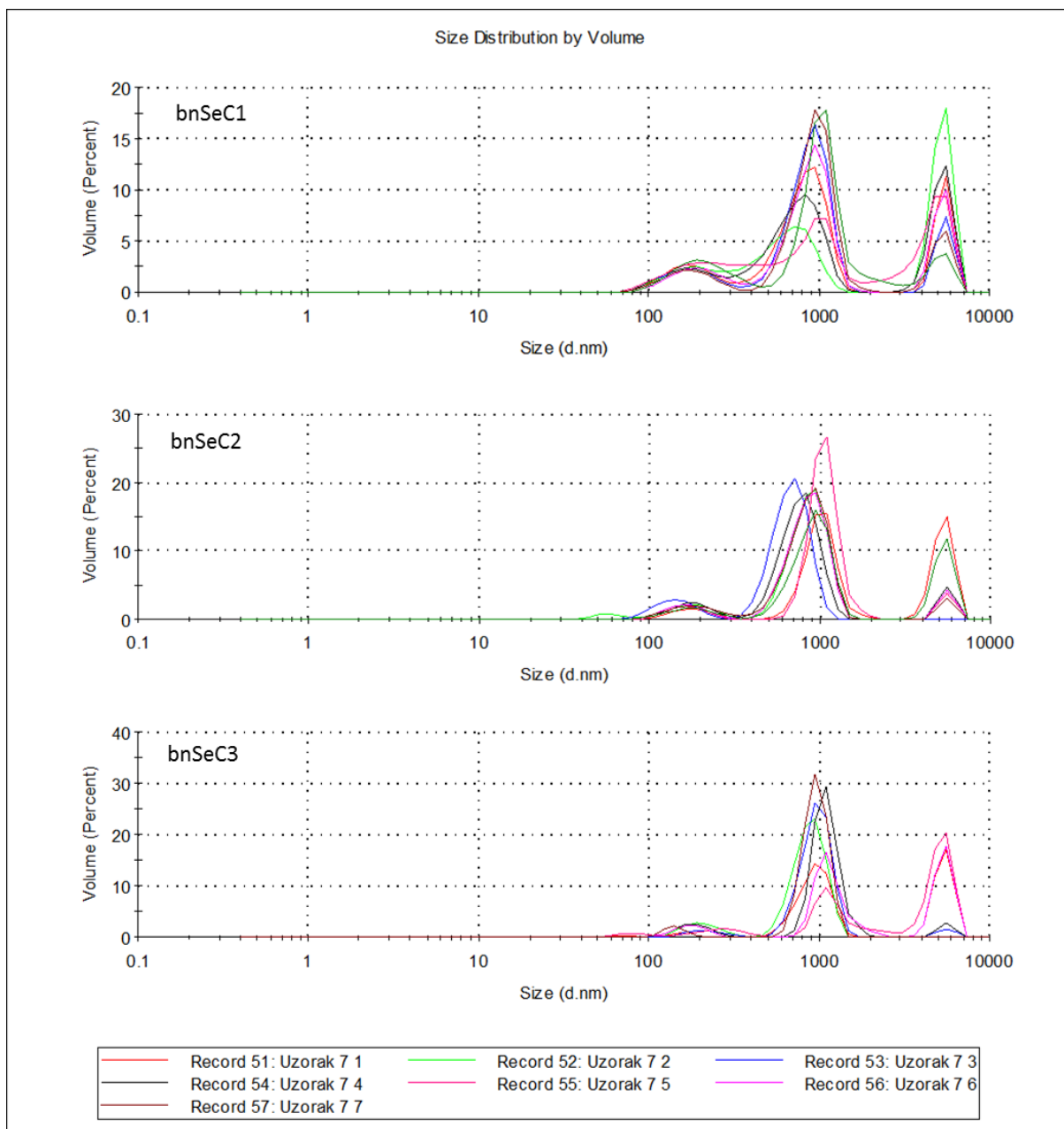
4.2. Raspodjela veličine čestica, zeta potencijal i stabilnost biogenog nanoselena

4.2.1 Raspodjela veličine čestica

Rezultati mjerenja veličine čestica nanočestica selena prikazani su na Slikama 12-14. Iz grafičkog prikaza prosječne vrijednosti hidrodinamičkog promjera za kemijsko sintetizirane nanočestice selena vidljiva je vrijednost od 169,7 nm dok za čestice koje su sintetizirane uz ekstrakte komine mandarine i rajčice se može primijetiti veća prosječna vrijednost hidrodinamičkog promjera. Za nanočestice selena sintetizirane uz ekstrakt komine mandarine ona iznosi prosječno 566,8 nm, dok za nanočestice selena sintetizirane u ekstrakt komine rajčice iznosi prosječno 395,5 nm. Iz dobivenih vrijednosti se može zaključiti da su nanočestice selena sintetizirane uz ekstrakte komine mandarine i rajčice puno veće, a samim time vjerojatno nestabilnije i manje bioraspoložive.



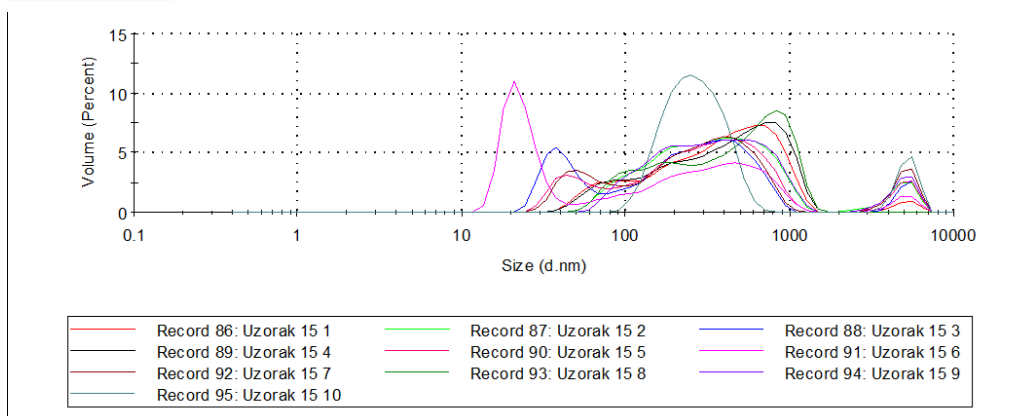
Slika 12: Raspodjela veličine čestica dobivenih kemijskom sintezom nanoselena (nSe)



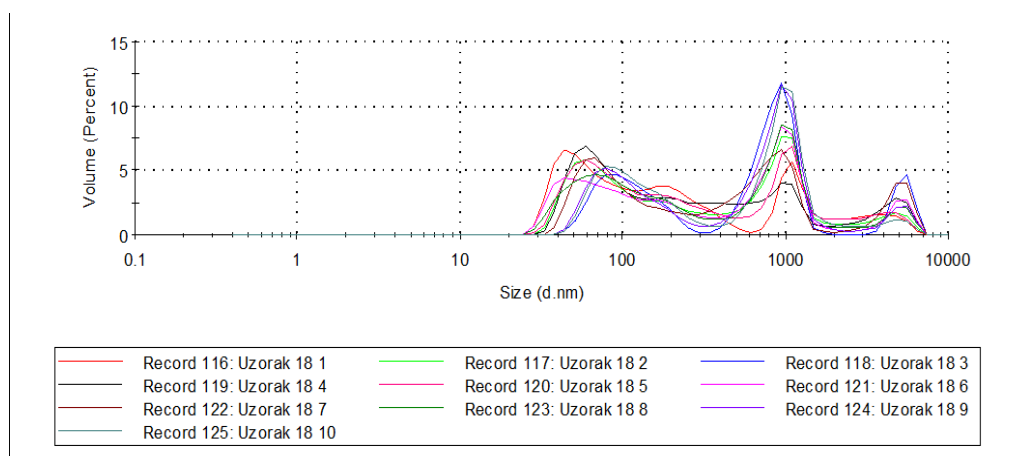
Slika 13. Prikaz raspodjele veličina čestica nanoselena dobivenog biosintezom iz ekstrakta kome mandarine

bnSeC1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kore mandarine; bnSeC2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kore mandarine; bnSeC3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kore mandarine

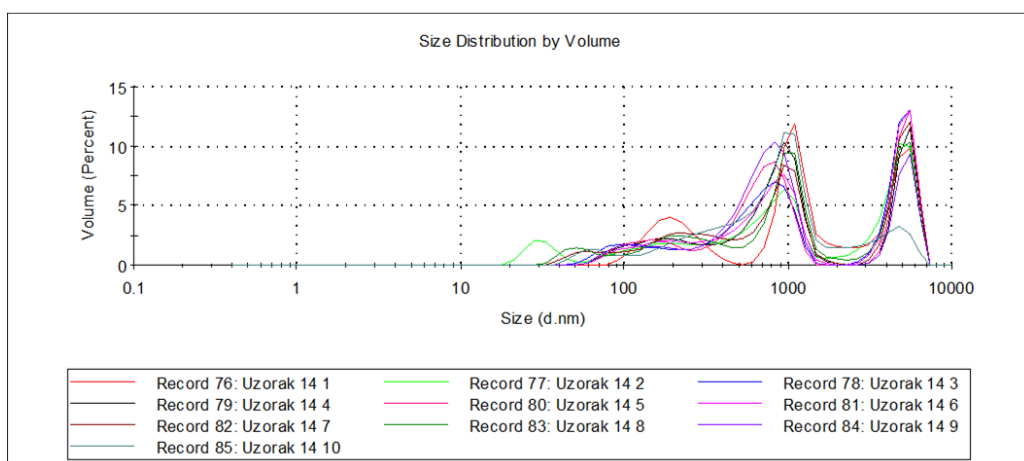
bnSeR1



bnSeR2

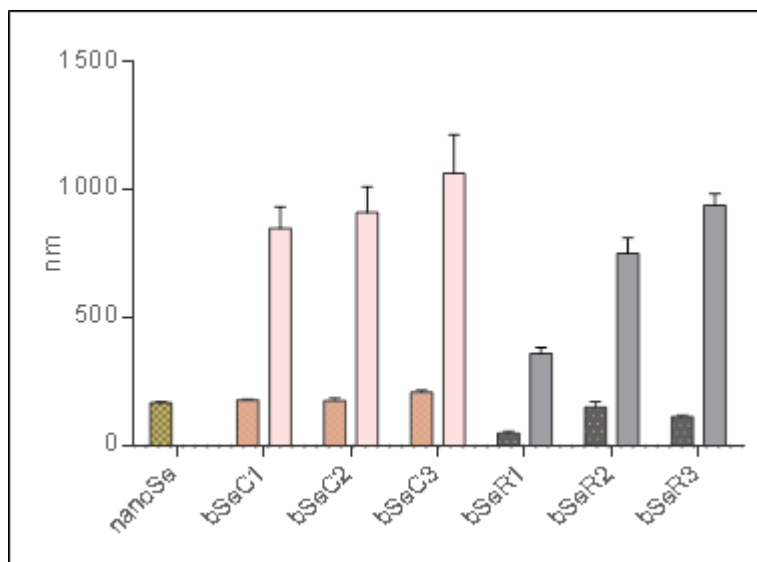


bnSeR3



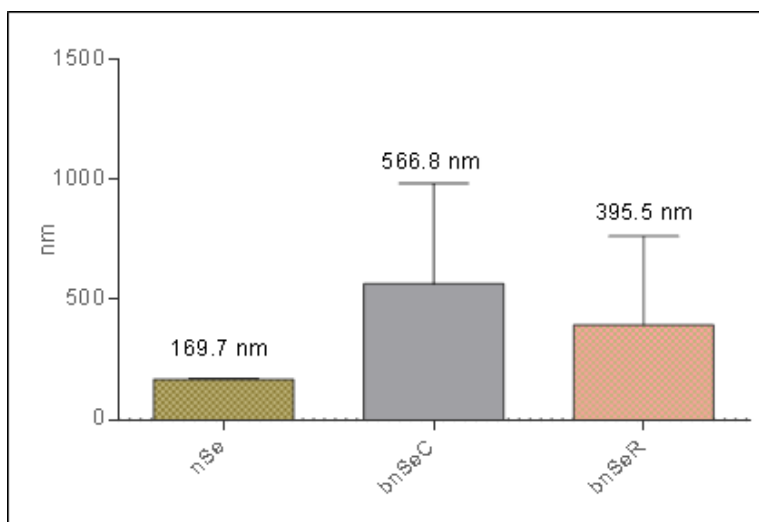
Slika 14. Raspodjela veličina nanočestica selena dobivenih uz ekstrakt komine rajčice

bnSeR1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta komine rajčice; bnSeR2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta komine rajčice; bnSeR3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta komine rajčice



Slika 15: Grafički prikazi vrijednosti srednjih polumjera frakcija nanočestica analiziranih uzoraka

bnSeC1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kore mandarine; bnSeC2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kore mandarine; bnSeC3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kore mandarine; bnSeR1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta komine rajčice; bnSeR2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta komine rajčice; bnSeR3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta komine rajčice



Slika 16. Grafički prikaz prosječne vrijednosti promjera kemijskog i fitonanoselena

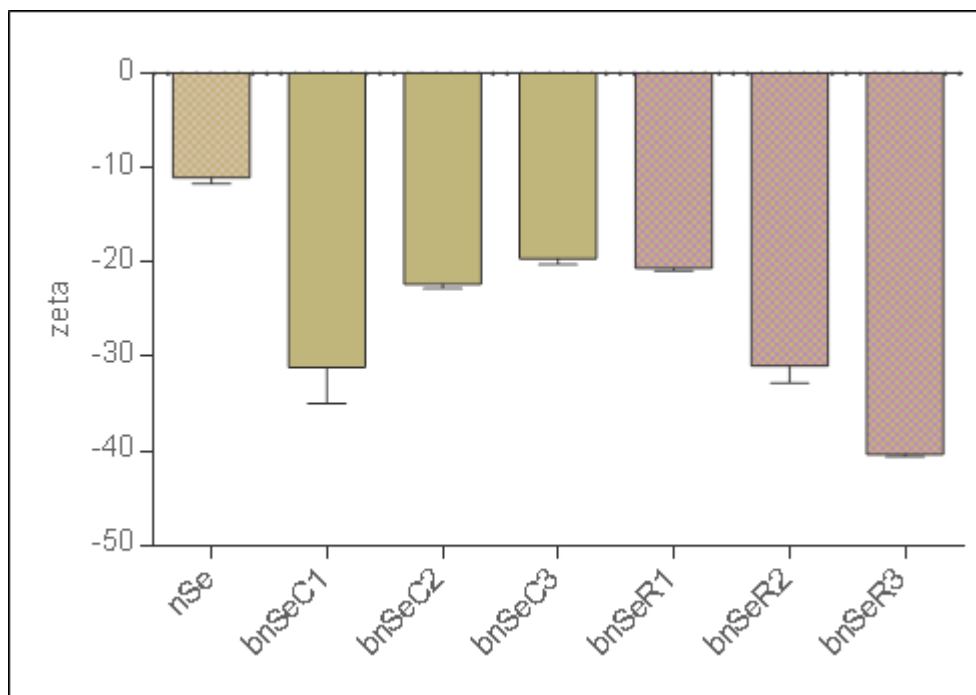
nSe-kemijski sintetiziran nanoselen; bnSeC-nanoselen sintetiziran uz ekstrakt kore mandarine; bnSeR-nanoselen sintetiziran uz ekstrakt komine rajčice

Iz prikaza na navedenim slikama vidimo kako je raspodjela veličine čestica kod kemijski sintetiziranog nanoselena unimodalna i uska. Za razliku od čestica kemijski sintetiziranog selena, kod čestica fitonanoselena koje su sintetizirane uz ekstrakte komine rajčice i mandarine je vidljiv bimodalan raspored i vrlo široka raspodjela čestica. Na Slici 16 je vidljivo da puno nanočestica u mjerenom uzorku bSeR prelazi hidrodinamički polumjer od 1000 nm, ali također da se javlja mnogo čestica sa polumjerom manjim od 50 nm. Što se tiče nanočestica selena sintetiziranih korištenjem ekstrakta komine mandarine vidljivi su veći volumni postotci na mjestima koji odgovaraju polumjeru većem od 1000 nm, ali također i veći volumni postotci manjih čestica koje posjeduju polumjer oko 200 nm.

Vizualnom provjerom uzoraka ustanovljeno je da su nanočestice koje su pripravljene korištenjem ekstrakta komine rajčice i mandarine stvorile velike aglomerate i da su već nakon vrlo kratkog vremenskog perioda vrlo nestabilne te da se talože na dnu kivete. Za razliku od toga, kod kemijski sintetiziranog nanoselena nema vidljivih znakova taloženja.

4.2.2 Zeta-potencijal i stabilnost nanočestica selena

Stabilnost biogeno sintetiziranog selena praćena je raspodjelom veličine čestica i mjerenjem zeta potencijala. Dobiveni rezultati su analizirani te uspoređeni s dostupnim podacima iz literature o fitosintezi nanoselena uz pomoć biljnih ekstrakata. Na Slici 17 prikazani su podaci dobiveni mjerenjem zeta potencijala kemijski- i fitosintetiziranog nanoselena.



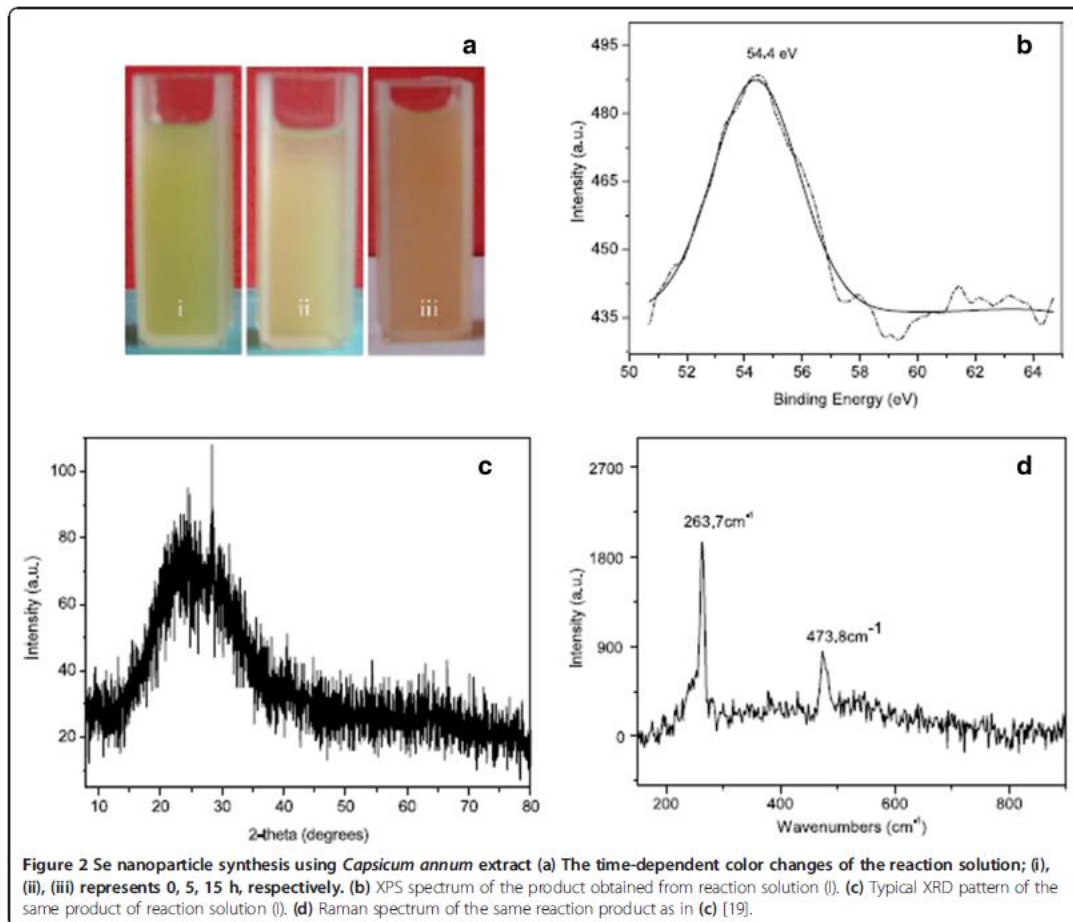
Slika 17: Grafički prikaz zeta potencijala nanočestica kemijski- i fitosintetiziranog nanoselena

bnSeC1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kore mandarine; bnSeC2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kore mandarine; bnSeC3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kore mandarine; bnSeR1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta komine rajčice; bnSeR2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta komine rajčice; bnSeR3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta komine rajčice

Na Slici 17 vidljivo je kako je iznos zeta potencijala izmjerenih nanočestica negativan. Može se primijetiti velika razlika u vrijednostima zeta potencijala za kontrolnu otopinu nanoselena i otopine nanočestica selena nastale fitosinteozom uz ekstrakte komine mandarine i rajčice. Apsolutne vrijednosti zeta potencijala su za navedene otopine sa mandarine i rajčice puno veće te iznose od -20 mV do -40 mV. Negativniji potencijal fitosintetiziranih nanočestica vjerojatno ukazuje na činjenicu da su se negativno nabijeni polifenoli iz korištenih biljnih ekstrakata adsorbirali na površinu nastalih nanočestica Se. Tome u prilog govori i činjenica da što je koncentracija ekstrakta u ispitivanoj otopini veća da je zeta potencijal niži. Slične je rezultate moguće pronaći na brojnim mjestima u literaturi.

Neki od primjera sinteze nanočestica selena iz biljnog ekstrakta mogu se pronaći u literaturi Mukherjee P., 2001. Jedna od varijacija nanočestica selena je nastala sintezom kad je H_2SeO_3 tretiran s biljnim ekstraktom *Capsicum annum* u vodenom mediju te u uvjetima niskog pH i okolišne temperature. Nastale nanočestice selena nazivaju se α -Se nanočestice. Ekstrakt *Capsicum annum* je u roku 12 sati nakon dodatka H_2SeO_3 iz karakteristične zelene boje

promijenio boju u karakterističnu crvenu koja je dokaz nastanka nanočestica selene te je analizom X-ray zrakama (XPS) utvrđeno pobuđivanje plazmatskih vibracija na površini čestica.



Slika 18. Prikaz sinteze i analize nanočestica selena dobivenih biosintezom iz ekstrakta *Capsicum annum* (Mukherjee P., 2001.)

Na gornjoj slici prikazani su neki od spektara nastalih analizom α -Se nanočestica sintetiziranih iz ekstrakta biljke *Capsicum annum*. Na dijelu slike označenom slovom b vidimo XRS spektra na kojem se vidi oštar pik na 54,4 eV što ukazuje na postojanost elementarnog Se. Na dijelu slike označene slovom c analiziranu pomoću XRD vidi se široki pik na 2 kuta od 15-35° što ukazuje na to da nanočestice selena nisu kristalizirale. Raman spektar na dijelu slike označenom slovom d pokazuje pik na 263,7 cm^{-1} što potvrđuje formiranje α -Se nanočestica. Slike α -Se nanočestica dobivene SEM i TEM metodama analize pokazuju nanoptice i nanoštapiće povezane sa proteinima *Capsicum annum* što ukazuje na nepravilnosti u njihovoj formulaciji. Najbliži i najviše povećan izvor slike za analizu pomoću skeniranja emisije polja elektronskom

mikroskopijom (FESEM), pokazao je na agregirane i sferične dijelove povezane sa proteinskim omotačem čineći površinu nepravilnom i hrapavom, to ukazuje na to da su proteini povezani vodikovim vezama dok su α -Se nanočestice povezane slabim Van der Waalsovima, može se uočiti digresija između ovih podataka iz literature i dobivenih vrijednosti zeta potencijala nanočestica Se sintetiziranih pomoću ekstrakata komine mandarine i rajčice ispitivanih u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

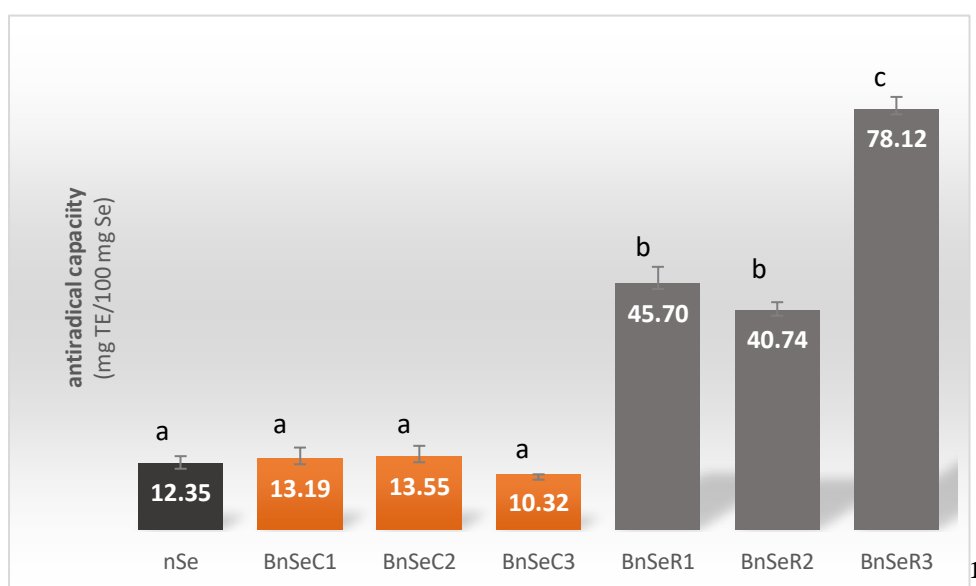
Što se tiče usporedbe veličine nanočestica Se nastalih biogenom sintezom, stabilne nanočestice selena priređene su sintezom uz dodatak ekstrakta biljke arjuna (*Terminalia arjuna*) u vodenom okruženju. One su analizirane UV-Vis spektrofotometrijom, X-ray zrakama, TEM analizom, FTIR analizom i XRD analizom. Svim tim analizama utvrđena je postojanost amino, hidroksil, ketonskih i karbonilnih veza koje omogućavaju stabilnost nanočesticama Se. (Selvaraj K., 2014.). Nanočestice selena sintetizirane iz ekstrakta sjemenki piskavice u vodenom mediju i pri sobnoj temperaturi su veličine između 50 – 150 nm. Korištene su protiv stanica raka dojke. (Ramamurthy, 2013.) Sjemenke piskavice sadrže brojna vlakna, ugljikohidrate, steroidne saponine, alkaloidne. (Khosla, 1995.) Može se zaključiti da navedeni primjeri ekstrakata iz kojih su sintetizirane nanočestice selena imaju svojstva koja pridonose većoj stabilnosti nanočestica, za razliku od ekstrakta mandarine i rajčice kod kojih pri sintezi nastaju vrlo nestabilne čestice.

4.3. Antioksidacijski potencijal fitosintetiziranog nanoselena

Poznato je da je antioksidativna uloga jedna od najvažnijih uloga koju selen posjeduje i da upravo zbog te uloge sudjeluje u mnogo antioksidativnih procesa u organizmu. Tomu najviše pridonosi činjenica što je sastavni dio mnogobrojnih enzima u tijelu kao što su grupa od 6 vrsta glutation-peroksidaza, tioredoksin-reduktaza, spermatozoa-specifična-tioredoksin-reduktaza, brojni selenoproteini i dr. (Klotz, 2003). Kao i selen, polifenolni spojevi koji se nalaze u sastavu ekstrakata komine mandarine i rajčice koji su proučavani u ovom eksperimentu sadrže antioksidativna svojstva, koja bi zajedno sa selenom trebala doprinijeti ukupnom antioksidativnom potencijalu (Kopjar, 2013). Osim što selen sam kao element posjeduje antioksidativna svojstva, ukoliko je oblikovan na način da je povezan s tvarima koji također posjeduju antioksidativna svojstva, njihova ukupna učinkovitost se povećava. Kemijski

sintetiziran nanoselen oblikovan je na način da je obložen PVP-om te kao takav neće imati sposobnost redukciji niti hvatanja slobodnih radikala. Hipoteza ovog istraživanja je da će fitonanoselen sintetiziran u prisustvu ekstrakata kore mandarine i komine rajčice, pokazivati jači antioksidativni potencijali zahvaljujući direktnim antiradikalnim učincima koji potječu od adsorbiranih polifenola.

4.3.1. TEAC antiradikalna učinkovitost fitosintetiziranog nanoselena



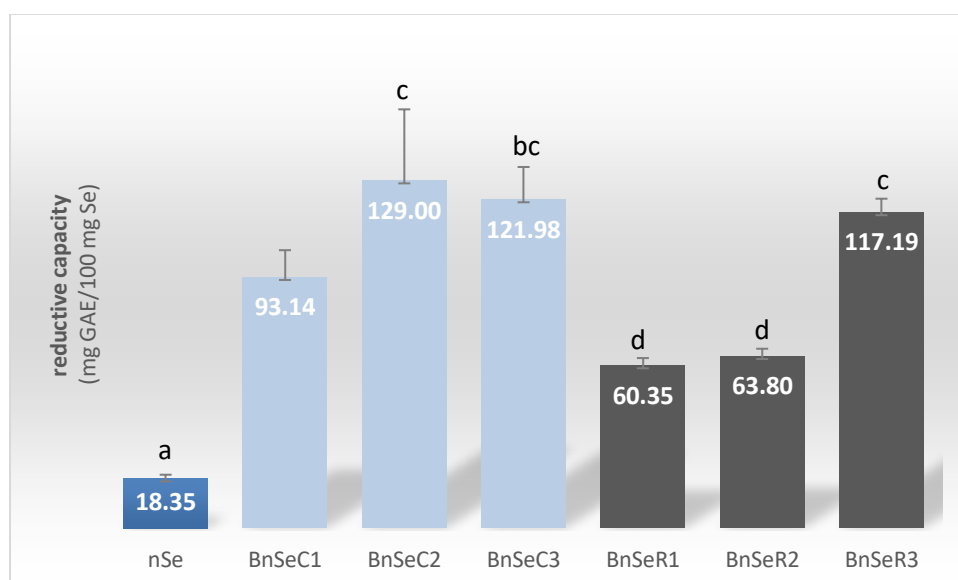
Slika 19: TEAC antiradikalna učinkovitost analiziranih nanočestica selena

bnSeC1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kore mandarine; bnSeC2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kore mandarine; bnSeC3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kore mandarine; bnSeR1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta komine rajčice; bnSeR2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta komine rajčice; bnSeR3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta komine rajčice. Stupići označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p > 0.05$)

Rezultati ispitivanja antiradikalne učinkovitosti nanoselena prikazani su na Slici 19. Prema očekivanjima, kemijski sintetiziran nanoselen nije pokazao znatnu antiradikalnu učinkovitost. Relativno mala vrijednost antiradikalne učinkovitosti kemijski sintetiziranog nanoselena može se pripisati askorbinskoj kiselini koja se nalazi reakcijskoj smjesi prilikom same sinteze, a koja je vjerojatno nakon čišćenja uzorka u maloj količini zaostala u uzorku. Uzorci nanoselena fitosintetiziranog uz ekstrakt komine rajčice pokazali su značajno veću

antioksidativnu aktivnost od nanoselena sintetiziranog iz ekstrakta kome mandarine (koji je bio usporediv s aktivnošću kemijski sintetiziranog nanoselena). Najvjerojatniji razlog ovakvog ishoda ispitivanja antiradikalne učinkovitosti selena je taj što antioksidansi koji se nalaze u ekstraktima mandarine zbog svojih strukturalnih karakteristika nisu adsorbirali na površinu PVP-om obloženih nanočestica selena te iako je kora mandarine bogata polifenolnim spojevima i karotenoidima od kojih svi pokazuju antireduktivnu učinkovitost, oni su uklonjeni iz reakcijske smjese tijekom čišćenja sintetiziranog fitonanoselena.

4.3.2 Reduktivna sposobnost fitosintetiziranog nanoselena



Slika 20. Reduktivna učinkovitost fitonanočestica selena u usporedbi sa kemijski sintetiziranim nanoselenom

bnSeC1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kore mandarine; bnSeC2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kore mandarine; bnSeC3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kore mandarine; bnSeR1-uzorak sintetiziran uz 0.33% ekstrakta kome rajčice; bnSeR2-uzorak sintetiziran uz 0.66% ekstrakta kome rajčice; bnSeR3-uzorak sintetiziran uz 0.99% ekstrakta kome rajčice. Stupići označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p > 0.05$)

Rezultati istraživanja redukcijuskog potencijala pokazuju drugačiji trend od rezultata istraživanja antiradikalnog učinka. Naime, sve sintetizirane fitonanočestice pokazale su značajno veći reduktivni potencijal od kemijski sintetiziranog nanoselena. Obzirom da polifenolne komponente iz ekstrakta kome rajčice i kore mandarine pokazuju i reduktivni i antiradikalni učinak, značajna reduktivna, a gotovo nepostojeća antiradikalna aktivnost fitonanoselena sintetiziranog uz ekstrakt kore mandarine ukazuje na mogućnost da su se na

površinu tih čestica adsorbirali reduktivni šećeri prisutni u ekstraktima korištenim u fitosintezi. Rezultati ovog istraživanja mogu se usporediti sa rezultatima istraživanja drugih autora koji su u svojim radovima pokazali da nanočestice selena sintetizirane iz biljnih, ali i drugih ekstrakata mogu pokazivati svoja antioksidativna svojstva putem mnogobrojnih mehanizama. Jedno od ispitivanja provedeno je na ekstraktu biljke češnjaka (*Allium sativum*). Antiradikalna učinkovitosti nanočestica selena sintetiziranih iz ekstrakta biljke *Allium sativum* provedena je pomoću ABTS radikala. Rezultat je pokazao da djelotvornu antiradikalnu aktivnost slobodnih radikala od strane nanočestica selena sintetiziranih iz ekstrakta biljke *Allium sativum*. Prosječni postotak aktivnosti nanočestica selena iznosi je 73% u usporedbi s ekstraktom *Allium sativum* u različitim koncentracijama koji je iznosio 65% (Deepa, 2013). Ispitivanje provedeno na biljci indijskog ogrozda (*Phyllanthus emblica*) u kojem je korištena DPPH metoda kao metoda ispitivanja antioksidativnog potencijala pokazala je da nanočestica selena biogeno sintetizirana iz ekstrakta biljke indijskog ogrozda u prisustvu DPPH radikala uklanja OH· radikale iz medija, navedeno uklanjanje radikala vidi se uz dekolorizaciju medija u kojem se reakcija provodi. Utvrđeno je da i bez prisustva DPPH radikala, sama nanočestica selena biogeno sintetizirana iz ekstrakta biljke indijskog ogrozda ima mogućnost uklanjanja OH· radikala ovisno o dozi te njena aktivnosti iznosi ~70,9% . Ove činjenice nam ukazuju na sposobnost antioksidativne aktivnosti nanočestica selena koje su sintetizirane iz ekstrakta biljaka (Gunti i sur. 2019). Treći primjer antioksidativne sposobnosti nanočestica selena sintetiziranih iz prirodnih ekstrakta vidi se iz podataka analize antioksidativne sposobnosti nanočestica selena sintetiziranih iz etanolnog ekstrakta pčelinjeg propolisa. U ovom primjeru ispitivanje antioksidativne sposobnosti nanočestica selena ispitivano je putem ABTS i DPPH radikala te iz rezultata je vidljiva potvrda velikog antioksidativnog potencijala ovako sintetiziranog nanoselena (Duran, 2011).

5. ZAKLJUČCI

1. Korištenjem ekstrakata kome rajčice/kore mandarine u sintezi nanoselena povećava se iskorištenje postupka, zbog povećanja redukcijskog potencijala reakcijske smjese
2. Fitosinteza nanoselena uz ekstrakte kome rajčice i kore mandarine rezultira nastankom nanočestica bitno različitih svojstava
3. Fitonanoselen sintetiziran uz ekstrakt kore mandarine/kominu rajčice karakterizira bimodalna raspodjela veličina čestica gdje su manje čestice usporedive sa kemijski sintetiziranima (oko 200 nm) dok su veće veličine oko 1000 nm. Nastale nanočestice imaju značajno niži zeta potencijal od kemijski sintetiziranih
4. Fitonanoselen sintetiziran uz ekstrakt kore mandarine ne pokazuje značajan antiradikalni potencijal, no pokazuje reduktivni potencijal značajno veći od kemijski sintetiziranog nanoselena. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da je tijekom sinteze došlo do adsorpcije reduktivnih šećera prisutnih u ekstraktima na površinu nastalih nanočestica
5. Fitonanoselen sintetiziran uz ekstrakt kome rajčice pokazuje značajan antiradikalni potencijal koji korelira sa udjelom ekstrakta u reakcijskoj smjesi, te značajan reduktivni potencijal. Ovi rezultati ukazuju na da je tijekom sinteze došlo do adsorpcije polifenola i/ili reduktivnih šećera prisutnih u ekstraktu kome rajčice na površinu nastalih nanočestica

6. LITERATURA

Akbaraly TN, Hininger-Favier I, Carriere I, Arnaud J, Gourlet V, Roussel AM, et al. Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. *Epidemiology* 2007, 18, 52-58.

Allen NE, Appleby PN, Roddam AW, Tjønneland A, Johnsen NF, Overvad K, et al. Plasma selenium concentration and prostate cancer risk: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am J Clin Nutr* 2008, 88, 1567-1575.

Aréchiga, C.F, Vázquez-Flores, S, Ortiz, O, Hernández-Cerón, J, Porras, A, McDowell, L.R, Hansen, P.J. Effect of injection of β -carotene or vitamin e and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 1998, 50, 65–76.

Bleys J, Navas-Acien A, Laclaustra M, Pastor-Barriuso R, Menke A, Ordovas J, et al. Serum selenium and peripheral arterial disease: results from the national health and nutrition examination survey, *Am J Epidemiol* 2009, 169, 996-1003.

Borošić J, 2016, *Glasilo biljne zaštite*, Uvjeti proizvodnje rajčice

Chaudari AN, Ingale AG,. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. *J Nanomed Nanotechnol*. 2013, 4 (165) , 1–7.

Corbel, S., Eikenberry S., *Astronomy & Astrophysics*, 2014, 419, 191-201

Crnomarković D, i Kiridžija M., Neretvanska mandarina oznaka izvornosti, Specifikacija proizvoda, 2014., str. 1

Davis S Biomedical applications of nanotechnology—implications for drug targeting and gene therapy, *Trends Biotechnol*. 2012, 15, 217–224.

Deepa B, Ganesan V, Biogenic synthesis and characterization of selenium nanoparticles using the flower of *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Int J Sci Res*, 2015, 4, 690-695.

Ducros V, Favier A. Selenium metabolism. *EMC Endocrinol. Nutr*. 2004, 1, 19–28.

Duran N., Marcato PD., Duran M., Yadav A., Gade A., et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi and plants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90 , 609-1624.

Foolad MR, Panthee DR, Ashrafi H, Kinkade M, . A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes, *Genome*, 2012, 52, 935-956

Gunti L, Dass R S and Kalagatur NK, *Front. Microbiol.*2019, 10, 931

Gutierrez, C; Corbera, J.A; Morales, I; Morales, M; Navarro, R. Uterine prolapse in 2 dromedary camels. *Can. Vet. J.* 2001, 42, 803–804.

Hansen J.C, Deguchi Y, Selenium and fertility in animals and man – A review, *Acta Vet. Scand.* 1996, 37, 19–30.

Hoffman J.L, McConnell K.P, Periodate-oxidized adenosine inhibits the formation of dimethylselenide and trimethylselenonium ion in mice treated with selenite, *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 254, 534–540.

Huang DJ, Ou BX, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem.* 2005, 53, 1841–1856.

Husen, Siddiqi: Plants and microbes assisted selenium nanoparticles: characterization and application. *Journal of Nanobiotechnology* 2014 12:28.

Jirong Y, Huiyun P, Zhongzhe Y, Birong D, Weimin L, Ming Y, et al. Sodium selenite for treatment of Kashin-Beck disease in children: a systematic review of randomised controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20, 605-13.

Karlson P, Luscher M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 1993, 183, 55–56.

Kasote D.M. , Katyare S.S , Hegde M.V, and Bae H, Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications, *International Journal of Biological Sciences*, 2015, 11, 982-991.

Khosla T, Lowe CR. Indices of obesity derived from body weight and height. *Br J Prev Soc Med.* 1995, 3, 122–128

Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr.* 2003

Koller L.D, Exon H.L, The two faces of selenium-deficiency and toxicity are similar in animals and man, *Can. J. Vet. Res.* 1986, 50, 297–306.

Kopjar N, Ternjej I., Gaurina Srček V., Mihaljević Z, Cytotoxic and genotoxic effects of water and sediment samples from gypsum mining area in channel catfish ovary (CCO) cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 98, 119-127

Li YH, Li XL, Wong YS, et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Biomaterials*. 2016, 32 (34) , 9068–9076.

Marković S., Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, 2005, 207-208.

Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan MI, Kumar R, Sastry M: Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *fusarium oxysporum*. *Chem Bio Chem* 2002, 5, 461–463.

Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review.

Oremland RS, Herbel MJ, Blum JS, Langley S, Beveridge TJ, Ajayan PM, Sutto T, Ellis AV, Curran S: Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 52–60.

Peng D, Zhang J, Liu Q, Taylor EW. Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J Inorg Biochem*. 2007, 10, 1457–1463.

Ramamurthy C, Sampath KS, Arunkumar P, Kumar MS, Sujatha V, Premkumar K, Thirunavukkarasu C: Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013, 36, 1131–1139.

Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr* 2008, 100, 254-68.

Renko K, Werner M, Renner-Muller I, Cooper T.G, Yeung C.H, Hollenbach B, Scharpf M, Kohrle J, Schomburg L, Schweizer U. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem. J*. 2008, 409, 741-749

Savatović S., Četković G. S., Čanadanović-Brunet J. M., Djilas S. M. (2010) Utilisation of tomato waste as a source of polyphenolic antioxidants. *Acta Periodica Technologica* 41: 187 - 194.

Schrauzer G.N, Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity, *J. Nutr.* 2000, 130, 1653–1656.

Sci. Total Environ. 2008, 400, 115–141.

Sharma G, Sharma AS, Bhavesh R, Park J, Ganbold B, et al. Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried vitis vinifera (Raisin) extract. *Molecules*, 2014, 19, 2761-2770.

Shen YH, Xie AJ, Yu XR, Zhang XZ, Yang LB, Li CH: Rapid, room-temperature synthesis of amorphous selenium/protein composites using Capsicum annum L. extract. *Nanotechno* 2007, 18, 405101–405109.

Shi L, Xun W, Yue W, et al. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Ruminant Res.* 2011, 96, 49–52.

Sims WL. History of tomato production for industry around the world, *Acta Horticulturae*, 1980, 100, 25-26

Spallholz, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 17, 45–64

Sunde RA. Selenium. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al., eds. Encyclopedia of Dietary Supplements. 2nd ed. London and New York: *Informa Healthcare*, 2010, str. 8

Terry EN, Diamond AM, Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, *Present knowledge in nutrition. 10th ed: Wiley-Blackwell*; 2012, 568-87

Thomson C.D, Selenium speciation in human body fluids, *Analyst*, 1998, 23, 827–831.

Torres SK, Campos VL, Leon CG, Rodriguez-Llamazares SM, Rojas SM, et al Biosynthesis of selenium nanoparticles by Pantoea agglomerans and their antioxidant activity. *J Nanopar Res.*, 2012.

Vego D: Sortiment mandarine na području Opuzena. *Pomologia Croatica* 2010, 16, 89-108

Vendeland, S.C.; Deagen, J.T.; Butler, J.A.; Whanger, P.D. Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biometals* 1994, 7, 305–312.

Ventura, M. R. ; Pielin, M. C. ; Castanon, J. I. R. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2009, 154, 271-275

Vrček V., Nanočestice i bakterije u crijevima. *Glas Koncila*, 2019

Whanger, P.D. Selenium and its relationship to cancer: An update. *Br. J. Nutr.* 2004, 91, 11–28.

Zamamiri-Davis F, Lu Y, Thompson J.T, Prabhu K.S, Reddy P.V, Sordillo L.P and Reddy C.C, Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency, *Free Radic. Biol. Med.* 2020, 32, 890–897.

Zheng S, Li X, Zhang Y, Xie Q, Wong Y.S, Zheng W, Chen T, PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction, *Int. J. Nanomed. Nanosurg.* 2012, 7, 3939–3949.

7. SAŽETAK

U okviru ove studije istražena je mogućnost korištenja ekstrakata kore mandarine i kumine rajčice bogatih polifenolima u fitosintezi nanočestica selena sa ciljem postizanja adsorpcije bioaktivnih komponenti iz navedenih ekstrakata na površinu nastalih nanočestica i postizanja poželjnih promjena njihovih svojstava. Postupci fitosinteze karakterizirani su obzirom na iskorištenje postupka raspodjelu veličina čestica, zeta potencijal, antiradikalnu i reduktivnu sposobnost. Korištenje istraživanih prirodnih ekstrakata povećava iskoristivost postupka biogene sinteze, a nastale čestice su značajno veće sa širom raspodjelom veličine čestica, te značajno negativnijeg zeta-potencijala u odnosu na kemijski sintetizirane.. Fitonanoselen sintetiziran uz kominu rajčice pokazivao je značajnu reduktivnu sposobnost dok je antiradikalna učinkovitost bila usporediva sa onom kemijski sintetiziranog nanoselena (zanemariva) što je vjerojatno posljedica adsorpcije reduktivnih šećera prisutnih u ekstraktu na površinu nanočestica. Fitonanoselen sintetiziran uz kori mandarine pokazao je znatno veću antiradikalnu i reduktivnu sposobnost u odnosu na kemijski sintetizirani nanoselen što je vjerojatno posljedica adsorpcije polifenola prisutnih u ekstraktu na površinu nanočestica. Usprkos prednostima, postupke fitosinteze nanoselena potrebno je dodatno optimirati kako bi se dobile uniformnije i manje nanočestice.

SUMMARY

The study investigated the possibility of using tangerine peel and tomato pomace extracts rich in polyphenols in the phytosynthesis of selenium nanoparticles. The goal was to achieve adsorption of bioactive components from these extracts on the surface of the nanoparticles resulting in desirable changes in nanoselenium properties. Applicability of proposed phytosynthesis processes was characterized in terms of utilization, particle size distribution, zeta potential, antiradical and reductive properties. The use of investigated natural extracts increased the efficiency of phytosynthesis process, and the resulting particles were significantly larger with a wider distribution of particle size, and significantly higher negative zeta potential. This is probably due to the adsorption of reducing sugars present in the extract on the surface of the nanoparticles. Phytonanoselen synthesized with mandarin peel showed significantly higher antiradical and reductive ability compared to chemically synthesized nanoselen, which is probably due to the adsorption of polyphenols present in the extract on the surface of nanoparticles. Despite the advantages, nano-selenium phytosynthesis processes need to be further optimized to obtain more uniform and smaller nanoparticles.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

FITOSINTEZA NANOSELENA PRIMJENOM EKSTRAKTA KOMINE RAJČICE I KORE MANDARINE

Maja Gagro

SAŽETAK

U okviru ove studije istražena je mogućnost korištenja ekstrakata kore mandarine i komine rajčice bogatih polifenolima u fitosintezi nanočestica selena sa ciljem postizanja adsorpcije bioaktivnih komponenti iz navedenih ekstrakata na površinu nastalih nanočestica i postizanja poželjnih promjena njihovih svojstava. Postupci fitosinteze karakterizirani su obzirom na iskorištenje postupka raspodjelu veličina čestica, zeta potencijal, antiradikalnu i reduktivnu sposobnost. Korištenje istraživanih prirodnih ekstrakata povećava iskoristivost postupka biogene sinteze, a nastale čestice su značajno veće sa širom raspodjelom veličine čestica, te značajno negativnijeg zeta-potencijala u odnosu na kemijski sintetizirane. Fitonanoselen sintetiziran uz kominu rajčice pokazivao je značajnu reduktivnu sposobnost dok je antiradikalna učinkovitost bila usporediva sa onom kemijski sintetiziranog nanoselena (zanemariva) što je vjerojatno posljedica adsorpcije reduktivnih šećera prisutnih u ekstraktu na površinu nanočestica. Fitonanoselen sintetiziran uz kori mandarine pokazao je znatno veću antiradikalnu i reduktivnu sposobnost u odnosu na kemijski sintetizirani nanoselen što je vjerojatno posljedica adsorpcije polifenola prisutnih u ekstraktu na površinu nanočestica. Usprkos prednostima, postupke fitosinteze nanoselena potrebno je dodatno optimirati kako bi se dobile uniformnije i manje nanočestice.

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

Rad sadrži: 48 stranice, 20 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 54 literaturnih navoda

Ključne riječi: nanočestice selena, kora mandarine, komina rajčice, antioksidacijsko djelovanje, fitosinteza, raspodjela veličine čestica

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

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

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

Maja Ortner-Hadžiabdić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan, 2020.

8. BASIC DOCUMENTATION CARD

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of food biochemistry
Domagojeva 2, Zagreb, 10000

Diploma thesis

PHYTOSYNTHESIS OF SELEN NANOPARTICLES USING EXTRACTS OF TOMATO POMACE AND TANGERINE PEEL

Maja Gagro

SUMMARY

The study investigated the possibility of using tangerine peel and tomato pomace extracts rich in polyphenols in the phytosynthesis of selenium nanoparticles. The goal was to achieve adsorption of bioactive components from these extracts on the surface of the nanoparticles resulting in desirable changes in nanoselenium properties. Applicability of proposed phytosynthesis processes was characterized in terms of utilization, particle size distribution, zeta potential, antiradical and reductive properties. The use of investigated natural extracts increased the efficiency of phytosynthesis process, and the resulting particles were significantly larger with a wider distribution of particle size, and significantly higher negative zeta potential. This is probably due to the adsorption of reducing sugars present in the extract on the surface of the nanoparticles. Phytonanoselen synthesized with mandarin peel showed significantly higher antiradical and reductive ability compared to chemically synthesized nanoselen, which is probably due to the adsorption of polyphenols present in the extract on the surface of nanoparticles. Despite the advantages, nano-selenium phytosynthesis processes need to be further optimized to obtain more uniform and smaller nanoparticles.

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

Thesis includes: 48 pages, 20 figures, 1 table and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Selen nanoparticles, mandarine peel, tomato pomace, antioxidative activity, phytosynthesis, size distribution

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner-Hadžiabdić, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: rujan, 2020.

